

MITOGÉN JELPÁLYÁK SZEREPE AZ ERITROID ÉRÉS SZABÁLYOZÁSÁBAN

Doktori (Ph.D.) értekezés

Brózik Anna
okleveles biológus

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
Biológia Doktori Iskola
Molekuláris Sejt- és Neurobiológia Program

Iskolavezető: **Dr. Erdei Anna**

Programvezető: **Dr. Sass Miklós**

Témavezetők:

Dr. Magócsi Mária, tudományos főmunkatárs
Dr. Sarkadi Balázs, egyetemi tanár, MTA lev. tag

Országos Gyógyintézeti Központ/Országos Vérellátó Szolgálat
Budapest
2009

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
ÖSSZEFOGLALÁS	4
SUMMARY	5
RÖVIDÍTÉSEK.....	6
1.1 A normál (egészséges) mieloid vérképzés	8
1.1.1 Az eritropoézis.....	9
1.1.2.1 Az eritropoetin receptor szerkezete és aktivációja.....	12
1.1.2.2 A legfontosabb jelátviteli mechanizmusok áttekintése az Epo-R példáján	
13	
1.1.2.2.1 A JAK-2 aktivációja és szerepe.....	13
1.1.2.2.2.1 STAT-5 aktiválódása	15
1.1.2.2.2.2 Mitogén- Aktivált Protein kináz (MAPK) kaszkád	16
1.1.2.2.2.3 A kalcium szerepe az eritroid differenciáció során	18
1.1.2.2.3 Az Epo receptor deszenzitizációja	19
1.2 Az apoptózis szabályozása	19
1.3 A transzkripció faktorok általános működési mechanizmusa.....	20
1.3.1 A c-Myb és szerepe a hemopoézisben.....	21
1.3.2 A c-Fos/ AP-1 és szerepe a hemopoézisben.....	21
1.3.3 Az Egr-1 és szerepe a hemopoézisben	22
1.3.4 Az NF-kB és szerepe a hemopoézisben	23
1.4 A hemopoézis megbetegedései	23
1.4.1 A mielodiszplázias szindróma	23
1.4.1.1 A TF-1 sejtvonal jellemzése.....	24
1.4.2 Mieloproliferatív rendellenességek.....	25
1.4.2.1 A K562 sejtvonal és jellemzése.....	25
1.4.2.1.1 A Philadelphia kromoszóma és a Bcr-Abl fúziós fehérje	25
1.4.3 Akut leukémiák: a hemopoetikus progenitorok sejtosztódásának és	
differenciációjának klonális megbetegedései.....	28
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	30

3. CÉLKITŰZÉSEK.....	39
4. EREDMÉNYEK.....	43
5. MEGBESZÉLÉS	79
6. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	93
7. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:.....	96
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban bemutatott munkámban a hematopoetikus differenciációt és a kapcsolódó jelátviteli mechanizmusokat vizsgáltam olyan modell-sejtekben, amelyek alkalmasak az egyes részfolyamatok elemzésére. Megállapítottam, hogy humán eritroleukémia (TF-1) sejtekben a GM-CSF növekedési faktor jelenlétében az eritropoetin (Epo) nem képes a differenciáció elindítására, azaz a hemoglobin szintézis fokozására, míg az ERK1/2 kinázok gátlása esetében létrejön a differenciáció. A differenciációnak kedvező körülmények között az Epo nem védi meg a sejteket a GM-CSF megvonás által előidézett apoptózistól. A GM-CSF az önfenntartó osztódások során aktiválja a Raf/MEK/ERK/Elk-1 MAP kináz útvonalat, a *c-Fos* és az *Egr-1* azonnali korai válaszadó gének átírását, valamint az Egr-1, az AP-1, az NF- κ B, a c-Myb és a STAT-5 transzkripciós faktorok DNS-kötő képességét. Ezzel ellentétben az eritropoetin a túléléshez és proliferációhoz kapcsolható jelpályákat nem aktiválja, és a GM-CSF éppen a fenti útvonalak aktiválásán keresztül gátolja az Epo hatására végbemenő differenciációt. A TF-1 sejtekben az intracelluláris kalcium szint emelkedése megakadályozza a differenciációt, mivel aktiválja az ERK-MAP kinázokat. Ugyanakkor ez a hatás a sejtek GM-CSF független túlélését, illetve osztódását eredményezi, és az említett a sejtválaszok kizárólag az ERK1/2 kinázok aktivitásától függenek.

Klinikai minták vizsgálata során megállapítottam, hogy a mielodiszplázia (MDS) betegség refrakter anémia csoportjába tartozó esetekben az Epo nem aktiválja a STAT-5 és ERK1/2 útvonalakat, ami megmagyarázhatja a betegségre jellemző vérszegénységet. Az MDS akut leukémiává alakulását követően, a felszaporodó leukémiás sejtekben mind a STAT-5 aktiváció, mind a c-Fos és az Egr-1 transzkripciós faktorok expressziója fokozottá válik és kiesik a citokinek szabályozása alól.

K562 leukémia sejtek vizsgálata során megállapítottam, hogy az ERK1/2 aktivitás gátlása fokozott hemoglobin szintézishez vezet, bár nem csökken a sejt szaporodás és nem fokozódik az apoptózis. A Bcr/Abl fúziós fehérjét célzó siRNSeK bejuttatása nem eredményezi a K562 sejtek pusztulását, azonban elegendő a Bcr/Abl szint átmeneti csökkentéséhez és a differenciáció indukciójához.

A kísérleti eredmények nagymértékben elősegíthetik a normális és kóros eritropoézisben működő jelátviteli mechanizmusok felderítését, jobb megértését.

SUMMARY

The aim of the presented studies was to elucidate the activity of signal transduction pathways known to be involved in cell survival and proliferation during the erythroid differentiation process. I have used myelodysplasia (TF-1) and chronic myeloid leukemia (K562) derived human myeloid leukemia cell lines to investigate erythroid differentiation induced by distinct approaches. Furthermore, I have explored the correlation of the alterations in cytokine stimulation induced signaling pathways linked to cell proliferation and development of myelodysplasia; as well as the correlation among the activity of the analyzed pathways and the transformation of MDS into acute leukemia.

Novel results presented in this work include that in a human erythroleukemia cell line TF-1, the presence of the growth factor GM-CSF completely inhibits Epo-induced erythroid differentiation whereas hemoglobin content increases upon inhibition of the ERK1/2 MAP kinases. Using experimental conditions suitable for differentiation Epo can not protect the cells from GM-CSF deprivation induced apoptosis. GM-CSF activates the Raf/MEK/ERK/Elk-1 MAP kinase pathway, the transcription of the immediate early response genes *c-Fos* and *Egr-1*, as well as the DNA-binding activity of Egr-1, AP-1, NF- κ B, c-Myb and STAT-5 transcription factors during self-renewal. In contrast, Epo does not activate these signaling events; moreover GM-CSF inhibits the Epo induced differentiation through the activation of the pathways mentioned above. The elevation of intracellular calcium concentration in TF-1 cells inhibits Epo induced cell differentiation through the activation of the ERK1/2 MAP kinases and results in factor-independent cell survival and growth.

By investigating clinical samples I have found that Epo does not activate the STAT-5 and ERK1/2 pathways in the refractory anemic group of myelodysplastic syndrome (MDS). Following MDS/AML leukemic transformation STAT-5 DNA binding activity, c-Fos and Egr-1 expression become independent of cytokine regulation. The observation that Epo is unable to activate STAT-5 in MDS samples whilst STAT-5 DNA binding is independent from cytokine stimulus in the case of AML may assist the development of novel diagnostic assay systems capable to distinguish MDS from the early period of AML.

By studying Bcr-Abl⁺ K562 cells I have found that inhibition of ERK1/2 activity leads to increased hemoglobin synthesis without the signs of cell cycle arrest or apoptosis. Targeting the Bcr-Abl fusion protein through retrovirally introduced shRNAs does not trigger cell death in K562 cells even at high transduction efficiency, yet it is enough to induce a transient reduction of Bcr-Abl protein level and results in differentiation. Thus, apoptosis and differentiation are independent processes in K562 cells.

RÖVIDÍTÉSEK

AML	<u>A</u> kut <u>M</u> ieloid <u>L</u> eukémia
AMV	madár mieloblasztózis vírus
AP-1	<u>A</u> ctivator <u>P</u> rotein- <u>1</u>
ATRA	<u>A</u> ll <u>T</u> rans <u>R</u> etinoic <u>A</u> cid
Bcr	<u>B</u> reakpoint <u>c</u> luster <u>r</u> egion
BFU-E	<u>B</u> urst- <u>F</u> orming <u>U</u> nit- <u>E</u> ritroid
BIM	<u>B</u> isz- <u>I</u> ndolil- <u>M</u> aleinimid
[Ca ²⁺] _i	szabad citoplazmatikus kalcium koncentráció
c-Abl	cellular Abelson
CDK	<u>C</u> yclin <u>D</u> ependent <u>K</u> inase
CFU-E	<u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit <u>E</u> rythroid
CML	Krónikus Mieloid Leukémia
c-myc	<u>m</u> yelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
c-myb	<u>m</u> yeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
CPA	ciklopiánsav
CRE	<u>c</u> AMP <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
CREB	<u>c</u> AMP <u>R</u> esponse <u>E</u> lement <u>B</u> inding protein
DICER	dsRNS-függő endonukleáz
EGFP	<u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
Egr-1	<u>E</u> arly growth <u>r</u> esponse protein-1
EKLF	<u>E</u> rythroid <u>K</u> rüppel- <u>L</u> ike <u>F</u> actor
Elk-1	Ets domén fehérje-1
Epo	eritropoetin
ERK	<u>E</u> xtracellular signal <u>R</u> egulated <u>K</u> inase
FAP1	Fos AP-1 responsive element
GM-CSF	Granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor
Grb2	<u>G</u> rowth factor <u>r</u> eceptor <u>b</u> ound protein
HIF-1	<u>H</u> ipoxia <u>I</u> ndukált <u>F</u> aktor-1
HSC	<u>H</u> ematopoietic <u>S</u> tem <u>C</u> ell
IGF-1-R	<u>I</u> nsulin like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor 1 <u>R</u> eceptor
IkB	<u>I</u> nhibitor <u>k</u> appa B
IL-3	<u>I</u> nterleukin-3

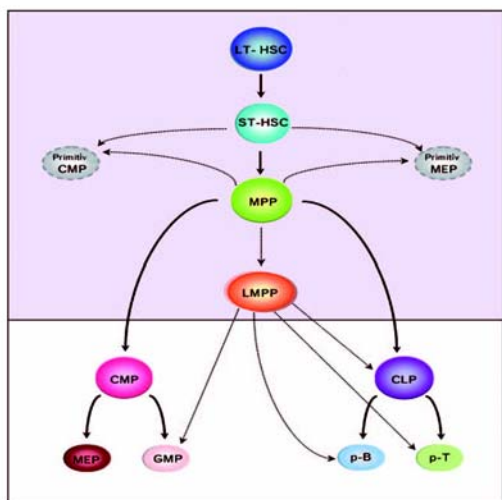
JAK	<u>J</u> anus <u>A</u> ctivated <u>K</u> inase
JNK	<u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inase
MAPK	<u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite
MDS	<u>M</u> ielodiszpláziás <u>S</u> zindróma
MEK	MAPK/ERK kináz
MPD	<u>M</u> yeloproliferative <u>D</u> isorders
NF-E2	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor of <u>E</u> rythroid-2
p90RSK	90 kDa <u>R</u> ibosomal <u>S</u> 6 <u>K</u> inase
PARP	<u>P</u> oli- <u>A</u> DP- <u>R</u> ibóz <u>P</u> olimeráz
PD98059	2'-amino-3-methoxiflavon (MEK-1 gátlószer)
PI	propidium jodid
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKC	<u>P</u> rotein <u>K</u> ináz <u>C</u>
PLC γ	foszfolipáz C gamma
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
PTP	<u>P</u> rotein <u>T</u> yrosine <u>P</u> hosphatase
RISC	<u>R</u> NA <u>I</u> nduced <u>S</u> ilencing <u>C</u> omplex
Sca-1	össejt antigén
SCF	<u>S</u> tem <u>C</u> ell <u>F</u> actor
SERCA	szarko-endoplazmatikus retikulum <u>C</u> a ²⁺ - <u>A</u> TPáz
shRNS	<u>s</u> hort <u>h</u> airpin RNS
SH2	src-homology 2
SHIP-1	SH2-domain containing inositol 5-phosphate phosphatase
SHP-2	SH2-domain containing phosphotyrosine phosphatase
SIE	v <u>S</u> is- <u>I</u> nducible <u>E</u> lement
SOCS	<u>S</u> uppressor <u>O</u> f <u>C</u> ytokine <u>S</u> ignalling
Sos	<u>S</u> on of <u>s</u> evenless
SRE	<u>S</u> erum <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
STAT	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription
STAT-5	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivator of <u>T</u> ranscription-5
TNFR	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrózis <u>F</u> aktor <u>R</u> eceptor
TRE	<u>T</u> PA <u>R</u> esponse <u>E</u> lement
UO126	1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadién

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A normál (egészséges) mieloid vérképzés

A vérképzőrendszer jellegzetes tulajdonsága, hogy másodpercenként milliós nagyságrendű érett sejt létrehozására képes. A megújulás felnőtt egyedekben a csontvelő igen ritka sejtpopulációjából, a hemopoetikus őssejtekből történik, amelyek egyedülálló tulajdonsága az önfenntartás és a differenciált sejthalakok felé való elköteleződés képessége. A szöveti mikrokörnyezet –a citokinek, sejt-sejt kölcsönhatásokat biztosító adhéziós molekulák, valamint az extracelluláris mátrixszal létesített integrin és cadherin kapcsolatok– határozzák meg az őssejt aktuális sejtválaszt, amely lehet differenciációs ingerek hatására egy specifikusabb progenitor sejtéérés, önmegújulás, vagy a nyugalmi állapot fenntartása (1). Az a mechanizmus, amely révén a külső környezet hatásai, illetve az esetlegesen szerepet játszó véletlenszerű események meghatározzák az őssejt első elköteleződési lépéseit multipotens progenitorsejteké, jórészt ismeretlen.

A még több irányú differenciációra képes multipotens progenitorsejt hierarchikus leszármazási sora, az újabb molekuláris biológiai eredmények alapján átrajzolódni látszik a korábban alkalmazott dichotómikus elágazódásokon alapuló modellel szemben (1.1. ábra) (2). A közelmúltban megjelent publikációk alapján egyre elfogadottabbá válik az a hipotézis, hogy a multipotens progenitorsejt elköteleződése nem egy (vagy néhány) sejttypussá való alakulás képességének megszerzése, hanem a multipotencia bizonyos komponenseinek az eltűnése vagy kizáródása, miközben az önmegújulás az adott szinten megmarad. A jelenlegi kísérleti adatok alapján nem tűnik valószínűnek, hogy a hemopoetikus őssejt legelső elköteleződési lépése a közös limfoid és a közös mieloid előalakká való szigorú szétválás, hanem az őssejt fokozatosan veszít el az egyes sejttypusokká alakulás képességét. A hosszú távú repopulációra képes őssejt legelső elköteleződési lépése az eritroid/megakariocita irányhoz szükséges gének elhallgattatása. A legkorábbi, de már valamilyen sejttypus irányában elkötelezett progenitor sejt a felnőtt csontvelőben (egér modellrendszerben) a limfoid irányba elindult multipotens progenitor (Lymphoid Primed Multipotent Progenitor). A multipotens prekurzorok unipotens progenitorokká való alakulásának közbülső lépései nem tisztázottak.

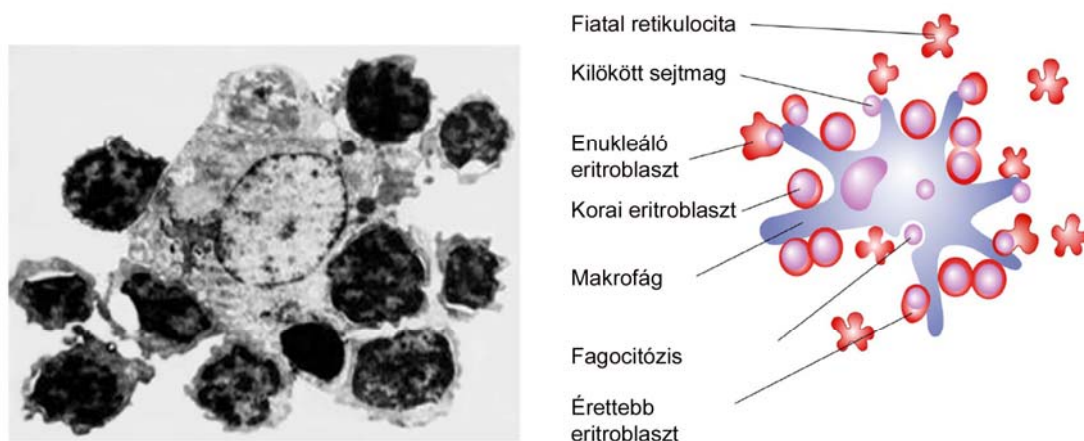


1.1. ábra A felnőtt hemopoetikus elköteleződés kezdeti lépéseinek (Buza-Vidas N, CurrOpHem 2007,14:315-321) által javasolt modellje

LT-HSC: hosszú távon repopuláló hemopoetikus őssejt, ST-HSC: rövid távon repopuláló hemopoetikus őssejt, MPP: multipotens progenitor, LMPP: limfoid irányba elindult multipotens progenitor, CMP: közös mieloid progenitor, CLP: közös limfoid progenitor, MEP: megakariocita és eritroid progenitor, GMP: granulocita makrofág progenitor, p-T: T sejt prekursor, p-B: B sejt prekursor

1.1.1 Az eritropoézis

Az érett vörösvérsejtek az eritropoézis folyamata során alakulnak ki (3), amely egészséges felnőttek esetében a csontvelőben történik. A csontvelői sejtek 5-30%-át képezik az eritropoetikus elemek, amelyek az intertrabekuláris terek központjaiban helyezkednek el, és kisebb, 15-25 sejtből álló klasztereket képeznek. Az eritropoézis egyik legfontosabb regulátora az eritropoetin hormon (Epo) (4-8), amely visszacsatolós szabályozó folyamatok révén biztosítja a fizioológias körülményeknek megfelelő szöveti oxigén-ellátottsághoz szükséges vörösvérsejt-számot. Az eritropoetin hipoxia hatására a vesében keletkezik (8); (5-7). Az eritropoetin és az eritropoetin receptor génnek *in vivo* inaktivációja bizonyította, hogy mindkét géntermék elengedhetetlen az eritroid sejthalakok kialakulásához (9, 10). Eritroid progenitorok esetében a legkorábbi, BFU-E (burst forming unit-erythroid) alakoknál jelenik meg először az eritropoetin receptor, de a sejtek Epo-függőséget csak a CFU-E (colony forming unit-erythroid) alaktól mutatnak (11).



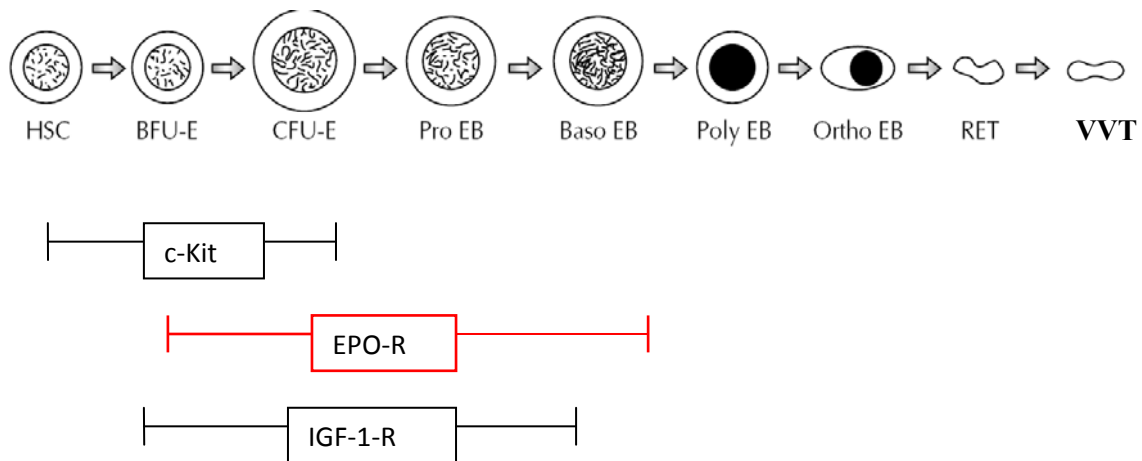
1.2. ábra Az eritropoézis fiziológias helye a csontvelőben: az eritroid niche (Chasis et al. *Blood* 2008 112:470-478 alapján)

A csontvelőben a fiziológias eritropoézis színterei az ún. eritroblaszt szigetek (1.2 ábra) (12). Ezek olyan specializálódott mikrokörnyezetek, amelyekben egy központi makrofág közvetlen környezetében, avval sejt-sejt kapcsolatokat létesítve, az eritroid előalakok osztódnak, differenciálódnak és a sejtmagjuk kilökődik (1.2 ábra). Az eritroid progenitorsejtek rendelkeznek olyan autonóm differenciációs programmal, amely terminális differenciációjukat *in vitro* is lehetővé teszi eritropoetin hormon jelenlétében, azonban a proliferációs és differenciációs kapacitás mesterséges rendszerekben nagyságrendekkel elmarad a fiziológias körülmények esetében tapasztalhatótól. A centrális makrofág részt vesz az eritroid előalakok osztódásának és differenciációjának szabályozásában. Ezt a funkciót egyrészt szolubilis faktorok termelésén keresztül tölti be, másrészt olyan sejt-sejt kapcsolatokat alakít ki, amelyek anti-apoptotikus hatásúak és a sejtosztódást serkentik a BFU-E és CFU-E sejtalakok esetében.

A kizárólagos eritroid differenciáció felé való végleges elköteleződés valószínűleg a BFU-E és CFU-E alakok között történik meg, mivel a BFU-E progenitorokból még keletkezhetnek eritroblasztokat és megakariocitákat egyaránt tartalmazó vegyes kolóniák, valamint bizonyos megakariocita-specifikus markereket expresszálnak a CFU-E progenitorok is (13).

Az eritroid differenciációs kaszkád egyes stádiumait reprezentáló progenitor sejtek különböző citokin szabályozás alatt állnak (1.3 ábra). A legkevésbé érett alakok növekedése SCF citokint (stem cell faktor, receptora a c-Kit) igényel, majd a korai BFU

sejtek felszínén megjelenik az Epo receptor és az IGF-1-R (Insulin like Growth Factor Receptor). A legkorábbi eritroid előalakok az Epo receptor olyan rövid splice variánsát fejezik ki, amely nem közvetít növekedési és túlélési jeleket, hanem kizárólag az eritroid differenciációt segíti elő. A későbbi CFU-E alakokon ezt a receptor formát fokozatosan az az Epo receptor forma váltja fel, amely egyidejűleg biztosítja az eritroid előalakok növekedését, túlélését és differenciációját (14).



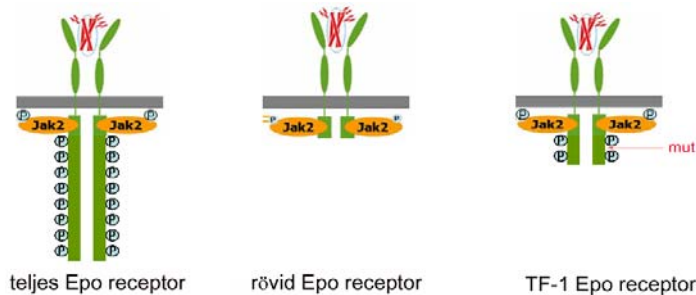
1.3 ábra Az eritroid differenciációs kaszkád és a legfontosabb regulátor citokin-receptorok

HSC: hemopoetikus őssejt, BFU-E:burst forming unit erythroid, CFU-E: eritroid kolóniaképző egység, ProEB: proeritroblaszt, BasoEB: bazofil eritroblaszt, Poly EB: polikromatofil eritroblaszt, OrthoEB: ortokromatofil eritroblaszt, RET: reticulocita, VVT: vörösvérsejt

Az eritroid differenciációs kaszkád sejtalakjai fejlettségi sorrendben a következők: proeritroblasztok, a bazofil eritroblasztok, a polikromatofil eritroblasztok és a piknotikus eritroblasztok (1.3 ábra). A reticulocitákban történik meg a sejtorganellumok degradációja, amely az apoptotikus folyamatoktól mind az ultrastrukturális változásokat, mind az effektor mechanizmusokat tekintve különbözik (15-17). A perifériás vérben érett vörösvérsejtek és ritkán reticulociták találhatók.

1.1.2 Az eritropoetin receptor és jelátvittele

1.1.2.1 Az eritropoetin receptor szerkezete és aktivációja



1.4 ábra A fiziológiásan előforduló eritropoetin receptor variánsok és a TF-1 leukémia sejtvonal eritropoetin receptorának szerkezeti felépítése

A teljes Epo-R a CFU-E, a rövid Epo-R a BFU-E érettségi állapotra jellemző. A TF-1 Epo-R az általunk használt leukémiás sejtvonal kromoszómális transzlokáció következtében kialakult receptora.

A humán Epo-R gén 6500 nukleotidból áll és 8 exon kódolja. Az Epo-R génjéről két funkcionális Epo-R forma íródik át. A teljes hosszúságú polipeptid 508 aminosavból áll és 66 kDa molekulatömegű fehérjevezeték alkot (amely több helyen glikozilálódik) és az összes exont tartalmazza (Epo-R/F). Ezen kívül keletkezik egy rövid Epo-R fehérje is a VIII. exon kihagyásával, amely egy 46 kDa molekulatömegű, ún. csonka receptor-forma (Epo-R/T). Ez utóbbi a citoplazmatikus részén kizárólag a JAK-2 (Janus Activated Kinase) kötésért felelős fehérjeszakasz található meg, a foszforilálható tirozin maradékokat tartalmazó C-terminális domén hiányzik belőle. Az Epo-R két formájának mennyisége dinamikusán változik az eritroid érés Epo-függő szakasza során (18, 19) (1.4 ábra).

Az eritropoetin receptor a citokin I receptorcsalád tagja. Ugyancsak ebbe a fehérjecsaládba tartozik és jelátviteli mechanizmusait tekintve számos hasonló elemet tartalmaz az IL-3 receptor és a GM-CSF receptor is. Ezen receptorokra általánosan jellemző, hogy N-terminálisan elhelyezkedő ligand-kötő doménjük egy jellegzetes WSXWS motívumot tartalmaz a transzmembrán régió közelében. Az Epo receptor további jellemző szerkezeti egysége két, konzervált „multi- β -lánc” motívum az extracelluláris doménben. Ezt követi egy transzmembrán α hélix régió, amelynek megfelelő konformációja elengedhetetlen a receptor-aktivációhoz, és egy C-terminális citoplazmatikus domén. Ez utóbbiban található a membránközeli Box1 és Box2 régió, majd attól C-terminálisan nyolc potenciálisan foszforilálható tirozin aminosav-maradék. A

receptornak önálló kináz aktivitása nincs (20). A rövid Epo-R forma (Epo-R/T) a citoplazmatikus részében csak a membránközeli Box1 és Box2 régiókat tartalmazza. Krisztallográfiai vizsgálatok alapján az Epo-R ligand hiányában is dimerként található a plazmamembránban (21).

A ligand kötést követően az Epo-R dimer mindkét fehérjeláncának extracelluláris doménjeiben konformáció-változás történik, amelynek hatására a receptorhoz asszociálódott Janus-kinázok aktiválódnak. A JAK-2 aktivációjához a transzmembrán α hélix és a membránközeli Box1 és Box2 régiók megfelelő orientációja szükséges. Ezt követően az aktiválódott tirozin kinázok foszforilálják az Epo-R citoplazmatikus doménjének tirozin aminosav-maradékait. A foszforilált tirozin aminosav-maradékokhoz SH2 domént tartalmazó effektor fehérjék kapcsolódnak. Az aktív receptornak, illetve a hozzá kapcsolódó adaptor fehérjéknek köszönhetően a plazmamembrán közelébe kerülnek és aktiválódnak a különféle jelátviteli kaszkádokat elindító kinázok. (21, 22)

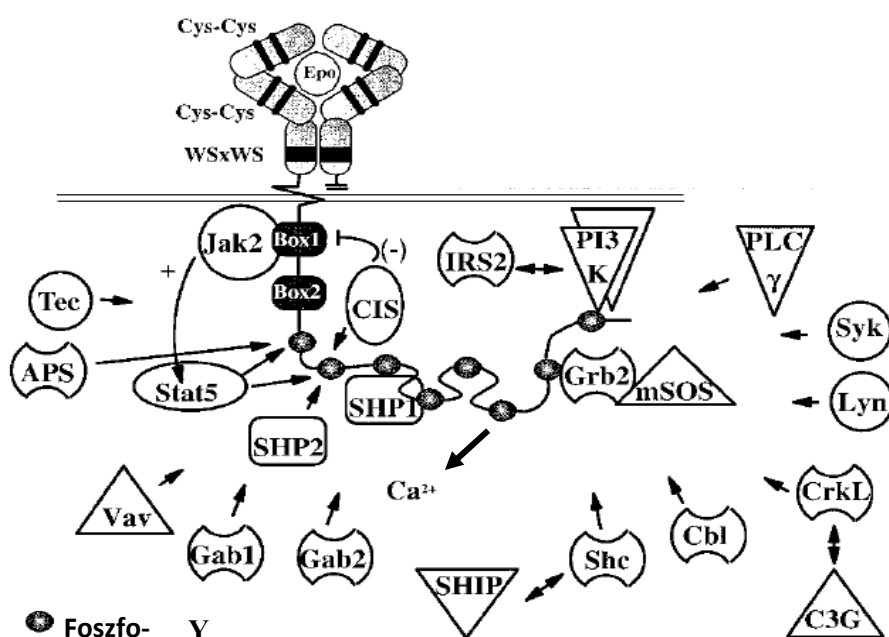
1.1.2.2 A legfontosabb jelátviteli mechanizmusok áttekintése az Epo-R példáján

1.1.2.2.1 A JAK-2 aktivációja és szerepe

Az eritropoetin receptor-jelátvitel legkorábbi eseménye a JAK-2 kinázok ligand kötés hatására bekövetkező dimerizációja, majd auto- és/vagy transz-foszforilációja (21). Annak ellenére, hogy a JAK-2 aktiváció elengedhetetlen az Epo receptorról elinduló jelátviteli folyamatok (és fiziológiás válaszok) elindításához, a JAK-2 aktiváció mechanizmusáról és főként a kinázzal kölcsönhatásba lépő egyéb fehérjéről nagyon keveset tudunk. A JAK-2 kináz olyan tirozin aminosav-maradékokat foszforilál, amelyek egy jellegzetes, YXX{L/I/V} szekvenciájú aminosav-környezetben helyezkednek el. Az Epo-R citoplazmatikus régiójának nyolc tirozinjából négyre jellemző ez a motívum, valamint néhány olyan fehérjében is megtalálható, amelyek az Epo-R aktivációját követően kötődnek a receptorhoz (például a Grb2 adaptor és a Shp2 foszfatáz) (11). A JAK-2 egyik legfontosabb szubsztrátjára a STAT-5-re (Signal Transducer and Activator of Transcription-5) ugyanakkor nem jellemző az említett motívum jelenléte. A *jak2* gén kiütése egerekben embrionálisan letális (11).

1.1.2.2.2 Az eritropoetin receptor Box1 és Box2 régót követő C-terminális citoplazmatikus doménjéhez kapcsolódó effektorok és az általuk aktivált jelátviteli útvonalak

Több mint 21 fehérjéről írták már le, hogy képes az aktivált, teljes hosszúságú Epo-R nyolc foszfo-tirozin maradékának valamelyikéhez kötni és ezáltal további fehérjék működését befolyásolni (11, 21). A 4. ábrán az aktív Epo receptorhoz kapcsolódó fehérjék szerepelnek (21).



1.5 ábra Az eritropoetin receptor foszforilált tirozin maradékairól elinduló jelátviteli útvonalak

Az Epo- receptorhoz kapcsolódó effektor molekulák között szerepelnek:

- protein tirozin kinázok (Lyn, Syk, Tec)
- protein tirozin foszfataázok (SHP1, SHP2)
- foszfolipid módosító enzimek (PI3-K, PLC γ , SHIP)
- nyolc különböző adaptor fehérje (Grb2, Shc, Cbl, CrkL, APS, IRS-2, Gab-1, Gab-2)
- nukleotid csere faktorok (Vav, C3G, mSOS)

A teljes hosszúságú Epo receptor tehát egyidejűleg számos jelpályát is aktivál, amelyek közül a legfontosabbak: a Ras/Raf/MEK/ERK, a STAT-5, a PI3K, a PLC γ és a PKC aktivációja.

Az Epo-R által közvetített fiziológiás hatások közül egyértelműen bizonyított az eritroid progenitorok apoptózistól való megóvása, ám az hogy az Epo-R miképp segíti elő a differenciáció folyamatát, illetve milyen szerepet tölt be az eritroid progenitorok sejtosztódásának szabályozásában, csak részben tisztázott (11). Az Epo-R nyolc foszforilálható tirozin aminosav maradékának *in vivo* szerepe egér modellrendszerben továbbra is kérdéses (11, 23).

Kísérleteink során az eritroid differenciációval összefüggésben elsősorban a STAT-5 és az ERK1/2 MAPK útvonalak aktiválódását vizsgáltuk. A továbbiakban ezeket az útvonalakat tekintjük át részletesen.

1.1.2.2.2.1 STAT-5 aktiválódása

A STAT-5 transzkripciós faktor SH2 doménjén keresztül az Epo receptor P-Y(343) és P-Y(401) foszfo-tirozinjaihoz kötődik, majd a JAK2 foszforilálja. A foszforiláció következtében a STAT-5 fehérje olyan konformáció-változáson megy át, amelynek hatására leválik a receptorról és SH2-doménjén keresztül dimerizálódik (24). A keletkezett dimer bejut a sejtmagba és a megfelelő konszenzus-szekvenciákhoz kötődve a vSis elemet tartalmazó gének aktivációjában vesz részt. A STAT-5 által szabályozott gének elsősorban a proliferációhoz és az anti-apoptotikus útvonalakhoz kapcsolhatóak, de találtak a STAT-5 targetek között eritropoetin sziganlizációt termináló fehérjét is.

A STAT-5 által expressziós szinten regulált fehérjék közül kiemelendő a Cis1 citokin szuppresszor (cytokine-inducible SH2 domain) (25); pim1 (egy citoplazmatikus Ser/Thr kináz,) (26), Bcl-xL (27), ciklin D (28), és a p21 ciklin dependens kináz inhibitor (29).

A Cis1 az SH2 doménjével az Epo receptor foszforilált tirozinjához kötve megakadályozza a STAT-5 receptor-kötését, valamint ubiquitinálódást követően hozzájárul a receptor degradációjához is (11).

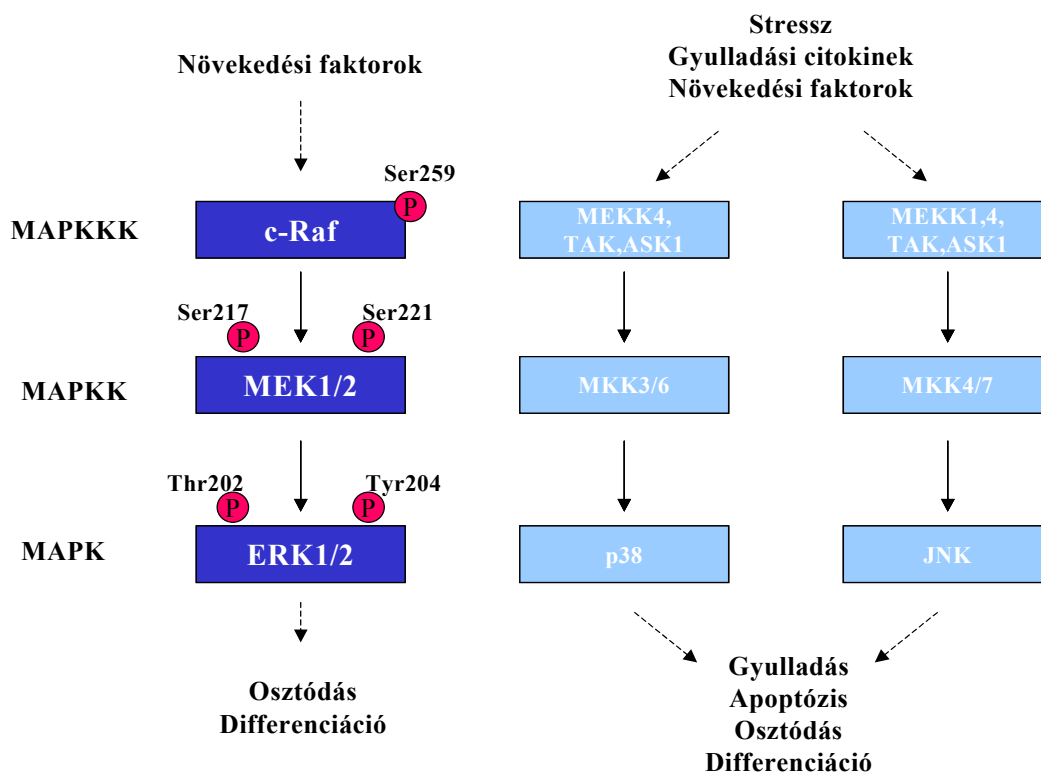
A Pim1 kináz aktiválja a c-Myc (30) és a c-Myb (31) proto-onkogéneket. Overexpressziója gátolja az apoptózist és hozzájárul mieloid sejtek hormonfüggetlen túléléséhez (32). A c-Myc expresszió szabályozásában részt vesz maga a STAT-5 transzkripciós faktor is (33). Mindezek alapján érthető, hogy miért nélkülözhetetlen az EpoR-indukált proliferációhoz a STAT-5 fehérje aktivációja (11, 34), ugyanakkor differenciációban betöltött szerepe a mai napig ellentmondásos. ELM-I-1 egér eritroleukémia sejtekben a domináns negatív STAT-5 expressziója elnyomja az Epo-indukált eritroid differenciációt (35). SKT6 modellsejt esetében a STAT-5-függő útvonalak

elősegítik a hemoglobin képződést (36). Ezzel szemben más modell rendszerben azt tapasztalták, hogy a STAT-5 aktiváció hiánya a differenciációnak kedvez (37). Az Epo-R különböző Tyr maradékainak célzott mutagenézisével, illetve a különböző hosszúságú citoplazmatikusan csonkolt eritropoetin receptorok vizsgálatával több munkacsoport is megállapította, hogy az Epo receptor membránközeli JAK2 kötőhelye valamint egyetlen, a STAT-5 kötésért felelős foszfo-tirozin (P-Y343) elegendő az Epo-függő eritroid differenciációhoz egér főtális máj, felnőtt egér csontvelő és különféle sejtvonal-alapú modellrendszerekben egyaránt (23).

1.1.2.2.2 Mitogén- Aktivált Protein kináz (MAPK) kaszkád

A MAPK jelátviteli útvonal egy aktivációs kaszkád, amely a receptorok által fogadott jelet felerősíti és továbbítja az adott hatásra választ adó gének szabályozó régióihoz (38, 39). A MAP kináz útvonalak egymást követő szerin/treonin kinázokból állnak, amelyek képesek foszforilálni és ezáltal aktiválni a szignalizációs kaszkádban utánuk következő (downstream) kinázt.

A három legfontosabb MAP kináz útvonal az ERK, a p38 és a JNK út, amelyek az utolsóként aktiválódó kinázzról kapták a nevüket (lásd 1.6 ábra) (40). Az Epo-R egyaránt aktiválja az ERK, a p38 és a JNK MAPK kaszkádot is (11). Az ERK1/2 MAPK kaszkád a sejtosztódáshoz kapcsolható, míg a stressz-aktivált MAPK útvonalak (p38 és JNK) szerepe nem teljesen tisztázott, mert a sejtválaszban betöltött szerepüket az alkalmazott kísérleti körülmények nagymértékben befolyásolják.



1.6 ábra A MAPK útvonalak felépítése

Az Epo-R, hasonlóan a többi citokin receptorhoz, a következő séma szerint aktiválja az ERK1/2 kinázokat: a ligand-kötés hatására aktiválódott JAK-2 foszforilálja a receptor citoszolikus részének azon tirozin aminosav maradékát, amely a Grb2 adaptor fehérje-Sos csere faktor komplex megkötéséért felelős. Az adaptor molekula közvetítésével a plazmamembrán közelébe lokalizálódó Sos nukleotid csere-faktor elősegíti a Ras GTP kötött formájának kialakulását. A Ras-GTP közvetlenül kapcsolódik a Raf szerin/treonin kinázhoz, amely így kikötődik a plazmamembránhoz és aktiválódik (41). Az aktív Raf foszforilálja a MEK kettős specificitású kinázt a szerin 218 és szerin 222 aminosavakon, ami annak aktiválódásához vezet (42). Ezt követően a MEK a treonin 183 és tirozin 185 aminosavakon foszforilálja és így aktiválja az ERK1 és ERK2 kinázokat (43). A maximális enzimaktivitáshoz mind a treonin mind a tirozin aminosav foszforilációja szükséges (44). Az aktivált ERK1/2 kinázok további fehérjéket foszforilálnak Ser/Thr oldalláncon. Ezek közül kiemelkedő fontosságúak a magba is bejutó kinázok, mint a pp90RSK, valamint az Ets családba tartozó transzkripciós ko-faktorok (Elk-1, Sap1a).

A Raf/MEK/ERK út aktiválódása kulcsfontosságú a citokin stimulus hatására történő osztódás és túlélés szempontjából (45).

Az Epo-R több, egymástól független módon is aktiválja a Ras/Raf/MEK/ERK útvonalat: az Y464 foszfo-tirozinhoz kötődő Grb2-Sos komplex közvetítésével (46), az Epo-R-SHP1-Grb2-Sos (47) és az Epo-R-Shp2-Grb2-SOS multiprotein komplexek kialakulása révén is (46, 48). Az Epo-R továbbá aktiválhatja az ERK1/2 kinázokat a PI3K (49) és a PKC közvetítésével is (50).

A MAPK kaszkádot az Epo hormonra adott proliferációs válasz mediátoraként tartják számon (51, 52). Humán CFU-E progenitorok esetében a MEK kináz farmakológiai gátlása megakadályozza az Epo-indukált sejtosztódást (53). Mindezek mellett a Raf/MEK/ERK MAPK kaszkád kulcs szerepet játszik hemopoetikus sejtek apoptózisának megakadályozásában is, mivel az említett jelátviteli útvonal a Bcl-2 család több anti-apoptotikus tagjának expressziós szintjét pozitívan regulálja (54). Ismert továbbá, hogy a Raf/MEK/ERK útvonal a Bad pro-apoptotikus fehérjét foszforiláció révén kivonja a forgalomból (55).

Az ERK MAPK kaszkád aktív szerepet játszik számos egyéb hemopoetikus sejttípus differenciációjában is (56-60). Ugyanakkor egyre több kísérleti eredmény utal arra, hogy az ERK1/2 aktivitás csökkenése kedvez az eritroid differenciációnak (61-64). Az ERK1/2 eritroid differenciáció során betöltött negatív regulátor szerepét tovább erősítik azok a közlemények, amelyek arról számolnak be, hogy a Ser/Thr specifikus foszfatázok megfelelő működése elengedhetetlen a differenciációhoz (62, 65).

1.1.2.2.2.3 A kalcium szerepe az eritroid differenciáció során

A citokin-receptorokra -az antigén receptorokkal ellentétben- nem jellemző a ligand-kötés hatására bekövetkező gyors, PLC γ -mediált citoplazmatikus szabad kalcium-koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) emelkedés. Ennek ellenére a kalcium, mint másodlagos hírvivő molekula fontos szerepet tölthet be az eritroid differenciáció során. Erre utal, hogy az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ emelkedik humán BFU-E alakok *in vitro* differenciációja során (66). Különbféle normál és transzformált eritroblaszt sejtek két fajta kalcium csatornát is nagy mennyiségben expresszálnak, amelyek szerepe egyenlőre nem tisztázott (67).

Eritropoetin kezelés hatására differenciációra már nem képes egér eritroleukémia sejteken (F4-6) kutatócsoportunk korábban azt állapította meg, hogy a citoplazmatikus kalcium-szint farmakológiai úton való megemelése a β -globin expresszió fokozását eredményezi (68). A farmakológiailag indukált $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés fokozza eritropoetin-érzékeny (ELMI-1) egér eritroleukémia sejtek globin expresszióját is (65, 68), valamint

fokozza az Epo kezelés hatását is (65, 69). Mindezek ellenére az Epo kezelés önmagában nem indukál citoplazmatikus kalciumszint emelkedést ELMI-1 sejtekben (65, 70).

1.1.2.2.3 Az Epo receptor deszenzitizációja

Az Epo-R-közvetített jelek elhallgattatása - akárcsak minden negatív regulációs esemény- kevésbé ismert folyamat. A SOCS család citokin szupresszorairól, egyes tirozin foszfatázokról és inozitol foszfatázokról bizonyított jelenleg, hogy az Epo-függő jelátviteli események leállító fehérjéi. A Cis-1 és a SOCS-3 fehérjék versengenek a STAT-5, Shp2 és SHIP-1 fehérjékkel a receptor kötésért, míg a SOCS-1 a JAK-2 kinázhoz kapcsolódva ubiquitináló fehérjekomplexet toboroz a receptorhoz, és ezáltal elősegíti a fehérjedegradációs folyamatokat (11).

Az Epo-függő vörösvértest érés Epo-függő szabályozásában négy tirozin foszfatáznak van kiemelkedő jelentősége: az Shp1, Shp2, CD45 és PTP-1B fehérjéknek. Ezek mindegyikéről kimutatták, hogy a JAK-2 kináz aktivitását befolyásolják (71-73).

1.2 Az apoptózis szabályozása

Az apoptózis, vagy más néven programozott sejthalál a specifikus funkció betöltésére alkalmatlan sejtek eltávolítására szolgáló természetes védekezési mechanizmus. Az apoptózis során a sejtben inaktív formában található cisztein proteáz kaszkád aktiválódik. A receptor-közvetített (Fas, TNFR) apoptotikus út a kaszpáz-8 és 10 (74), míg a stressz-aktivált apoptotikus út (éhezés, DNS károsodás, ER illetve mitokondriális stressz) a kaszpáz-9 és 12 iniciátor kaszpázok aktiválódásához vezet (75, 76). Az iniciátor kaszpázok hasítják és aktiválják a végrehajtó kaszpázokat, azaz a kaszpáz-3, 6 és 7 enzimeket (77). A végrehajtó kaszpázok olyan fehérjéket hasítanak, amelyek -többek között- a citoszkeleton és a DNS integritásáért felelősek (PARP (78), DFF45 (79), lamin A (80), α -Fodrin (81)). A különféle apoptotikus jelpályák egyéb jelátviteli útvonalakkal állnak kölcsönhatásban, amelyek erősítő vagy gátló finom-szabályozást tesznek lehetővé. Az apoptózis regulátorai között kiemelkedő szerepe van a Bcl-2 fehérjecsaládnak, amelyek pro-apoptotikus (pl. Bax, Bak, Bid, Bad) és anti-apoptotikus (például Bcl-2, Bcl-xL) tagjai ismertek (82). A Bcl-2 fehérjecsalád apoptózist elősegítő tagjai az apoptotikus jel hatására a citoszolból a mitokondriumhoz kötnek és azon pórus-szerű struktúrákat képezve elősegítik a citokróm-c kiáramlását. Az anti-apoptotikus tagok ezt a folyamatot különféle módon gátolhatják: vagy fehérje-fehérje kölcsönhatások révén akadályozzák a pro-

apoptotikus fehérjék mitokondriumhoz kötését, vagy a már létező pórus-szerű struktúrákat zárják el. A citoplazmába jutó citokróm-c elengedhetetlen a kaszpáz-9 iniciátor kaszpáz aktiválódásához. Mindezekből következik, hogy a pro- és anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék aránya szabja meg, hogy az apoptózis végbemegy vagy sem. A túlélési jelpályák jelentős része éppen a Bcl-2 fehérjecsaldába tartozó fehérjék mennyiségének illetve foszforilációjának szabályozásán keresztül gátolja az apoptózist. A foszforilálódott STAT-5 fehérje a Bcl-xL anti-apoptotikus fehérje expresszióját fokozza (83), míg az aktiválódott ERK1/2 kinázok a p90RSK és a CREB transzkripciós faktor aktiválásán keresztül fokozzák a Bcl-2 és Bcl-xl fehérjék mennyiségét (84, 85).

1.3 A transzkripciós faktorok általános működési mechanizmusa

A receptorok által aktivált különféle jelátviteli útvonalak transzkripciós faktorok működésének szabályozása révén vezetnek a sejt génexpressziós mintázatának megváltozásához, ily módon biztosítva a külső ingerre adott specifikus sejtválasz létrejöttét. A receptor-közvetített jelpályák aktivációjának következtében, már meglévő transzkripciós faktorok közvetítésével (új fehérje szintézise nélkül), elsőként íródna át az úgynevezett azonnali korai válaszadó gének. A transzkripciós faktorok specifikus DNS szekvenciákat ismernek fel (konszenzus szekvenciák). A regulátor szakaszoknál összegyűlő transzkripciós faktorok és ko-faktorok együttese odatoborozza a bazális transzkripciós apparátust, amely az így létrejövő bonyolult szerkezetű fehérjekomplexnek köszönhetően biztosítja az adott gén átíródását. Az azonnali korai gének termékei leggyakrabban újabb transzkripciós faktorok, amelyek megváltoztatják a sejt fehérje-összetételét és ezáltal a sejtfunkciót. A sejtben megtalálható transzkripciós faktorok a specifikus külső inger hatására többféleképp aktiválódnak:

- Egyes transzkripciós faktrok foszforiláció hatására aktiválódnak (ilyenek pl. a STAT transzkripciós faktorok, az AP-1 heterodimer transzkripciós faktor Fos és Jun tagjai, és a CREB transzkripciós faktor)
- Ismert transzkripciós faktorok reverzibilis acetilációja, amely befolyásolja transz-aktiváló képességüket (a GATA-1, EKLF, NF-E2 esetében bizonyított ez a típusú poszt-transzkripciós reguláció)
- Egyes transzkripciós faktorok génexpressziót szabályozó funkciója a sejtmagba való bejutás révén valósulhat meg, ilyen például az NF- κ B. Ez esetben a transzkripciós faktor nukleáris lokalizációs szignálját elfedi az I κ B (inhibitor kappa B) fehérje, amely a

foszforilációt követően proteolitikus úton lebomlik, lehetővé téve az NF- κ B sejtmagba való bejutását, ahol az a megfelelő gének promóteréhez kötődik és fokozza azok átíródását.

Egy adott gén transzkripciójának beindításához önmagában nem elegendő a transzkripciós aktivátorok működése, a kromatin szerkezetének is át kell alakulnia ahhoz, hogy az átíródás megfelelő hatékonyságú legyen. Azok a gén-regulátor szekvenciák, amelyek egymástól nagy távolságra helyezkednek el, kromatin-hurkok létrehozásával kerülnek egymás közvetlen közelségébe a sejtmagban. Ily módon a távoli szabályzó szekvenciák – azaz az enhancerek (mint pl. a globin gének lokusz kontroll régiói) – az általuk szabályozott promóterek fizikai közelségébe tudnak kerülni (86, 87).

1.3.1 A c-Myb és szerepe a hemopoézisben

A c-Myb proto-onkogén transzkripciós faktor egy 75kDa molekulatömegű transzkripciós aktivátor fehérje. A *v-Myb* -mely a madár myeloblasztózis vírus (AMV) kulcs onkogénje- egy Gag-Myb-Ets fúziós fehérjét kódol és kevert típusú leukémiát okoz (88). A c-Myb proto-onkogén transzkripciós faktor nagyfokú expressziója jellemző az éretlen, még osztódásban lévő hemopoetikus progenitor sejtekre (89, 90). Mennyisége a terminális differenciáció során lecsökken (91-93). A c-Myb az éretlen hemopoetikus sejtek proliferációját és differenciációját egyaránt szabályozza: fokozott expressziója gátolja az eritroid differenciációt (94), tönkretétele viszont embrionálisan letális anémiához vezet (95). A c-Myb konstitutív expressziója embrionális őssejtekben eritroid irányú elköteleződéshez vezet (96).

Epo hatására differenciálódó egér eritroleukémia (MEL) sejtekben a differenciáció kezdetekor átmenetileg csökken a c-Myb mRNS szintje és ugyanez tapasztalható különféle kémiai indukálószerrek hatására is (65, 97). Kutatócsoportunk korábbi munkái alapján egér eritroleukémia sejtvonalak esetében a differenciáció minden esetben együtt jár a c-myb mRNS szintjének gyors, átmeneti csökkenésével (65, 68, 69).

1.3.2 A c-Fos/ AP-1 és szerepe a hemopoézisben

A *c-Fos* növekedési faktor stimuláció hatására aktiválódó azonnali korai válaszadó gén, amelynek fehérje terméke szükséges a sejtciklusba való belépéshez és egyes anti-apoptotikus fehérjék expressziójához (98). A c-Fos-nak kulcs szerepe van a csontképződésben és a megfelelő hemopoézisben is (99). A c-Fos az Egr-1 transzkripciós faktoral együtt elengedhetetlen a mieloid irányú differenciációhoz, számos mieloid-

specifikus gén promóterének szabályozásán keresztül (100). Szerepe az Epo-indukált eritroid expanszió illetve differenciáció során ellentmondásos (63, 101-103).

A c-Fos transzkripció faktor részvétele a sejt génexpressziós mintázatának meghatározásában több szinten szabályozott. Mind a *c-fos* gén transzkripcióját, mind a keletkező fehérje transzaktiváló képességét a különböző szignálutak rendkívül összetett módon határozzák meg. A *c-Fos* promóterben megtalálható a v-Sis indukálható elem (SIE) -ehhez a STAT-5 kötődik-, a szérumszponz elem (SRE) (104), az AP-1 szerű szekvencia (FAP1) (105) és a cAMP szponzív elem (CRE). A c-Fos gén átíródását az AML-1 transzkripció faktor is fokozhatja. Hemopoetikus sejt típusok esetében a c-Fos expresszió egy transzkripció elongációs blokk révén is regulálódik, amelyet a citoplazmatikus kalcium koncentráció szabályoz (106). A Ras/Raf/ERK/Elk-1 szignálút elsősorban a szérumszponz elemén keresztül serkenti a gén átíródását (107). A megnövekedett $[Ca^{2+}]_i$ Elk-1-től függetlenül, Ca^{2+} /kalmodulin-függő kinázok közvetítésével is képes a *c-fos* expresszióját fokozni.

A c-Fos fehérje az AP-1 (aktivátor protein-1) transzkripció faktor tagjaként tölti be génregulátor funkcióját. Az AP-1 egy olyan dimer transzkripció faktor, amelyet a Fos és a Jun családba tartozó fehérjék változatos kombinációja építhet fel. Egy adott TRE-hez (TPA response element) való kötődés affinitását számos tényező befolyásolja, legfőképp az AP-1 komplex fehérje összetétele és a környező szekvenciák (108-110). Szerepe igen összetett, egyaránt szabályozhatja a sejtek apoptózisában, proliferációjában differenciációjában és onkogén transzformációjában szerepet játszó fehérjék expresszióját (111-113). Az AP-1 transzkripció faktort aktiválásának két fő mechanizmusa lehetséges: egyes szignáltranszdukció útvonalak a komponensek mennyiségének megváltozásához vezetnek, míg mások azok transzkripció aktivitását növelik meg.

1.3.3 Az Egr-1 és szerepe a hemopoézisben

Az *Egr-1* (early growth response 1) növekedési faktor/citokin stimuláció hatására aktiválódó olyan azonnali korai válaszadó gén, amely a GC gazdag DNS konszenzus szekvenciákhoz kötődő cink-ujj transzkripció faktor családba tartozik. A *c-fos* és az *egr-1* gének közös regulátor elemeket tartalmaznak. A legfontosabbak az SRE, a SIE és a CRE elemre kötődő transzkripció faktorok (114).

Az *Egr-1*-fehérjéről ismert, hogy szerepet játszik számos sejt típus osztódásában és bizonyos stressz-válaszokban is. A hemopoetikus őssejtekben (HSC) az *Egr-1* a nyugalmi

állapot megőrzéséért illetve az annak kedvező csontvelői mikrokörnyezetben való maradásáért felelős (115), míg a fehérje overexpressziója ugyanezen sejttípusban a makrofágok kialakulásának kedvez a többi sejttípus rovására (116). Az Egr-1 transzkripciós faktorokat, receptorokat, sejtciklus-regulátorokat és pro-apoptotikus fehérjéket kódoló géneket szabályoz. Overexpressziója fokozott ciklin D2 expresszióval jár együtt (117). Legújabb irodalmi adatok alapján az Egr-1 hipoxia hatására aktiválódik és közvetlenül szabályozza a *HIF-1 α* gén átíródását is (118).

1.3.4 Az NF- κ B és szerepe a hemopoézisben

Az NF- κ B/Rel transzkripciós faktor családba a p65/RelA, a p50(p105), a p52(p100), a RelB és Rel C fehérjék tartoznak. Az NF- κ B-nek kiemelkedő szerepe van a gyulladásos és egyéb immunválaszok aktiválásában (119), valamint a PI3K/Akt útvonal közvetítésével részt vesz a sejtek növekedéséhez és az apoptózis gátlásához szükséges fehérjék szintézisében is. Az NF- κ B által transzkripcionális szinten regulált fehérjék között szerepel a c-Myc és a c-Myb proto-onkogén transzkripciós faktor is.

Az NF- κ B-nek kulcs szerepe van az eritropoézis során, ugyanis az említett fehérjecsalád p105/p50, p100/p52 és p65 tagjait nagymértékben expresszálják a BFU-E prekurzorok, - amelyek igen gyors sejtosztódásra képesek - és mennyiségük lecsökken az eritroid érés folyamata során (120). Az NF- κ B transzkripciós faktort az EpoR/F is aktiválja (121), de sem a pontos mechanizmus, sem az eseményhez rendelhető sejtválasz nem tisztázott. Elképzelhető, hogy az NF- κ B aktiváció az Epo sejtosztódást stimuláló hatásával áll összefüggésben és a differenciáció során megjelenő fehérjék –például az α -globin- idő előtti expresszióját akadályozza meg (122).

1.4 A hemopoézis megbetegedései

1.4.1 A mielodiszpláziás szindróma

A *mielodiszpláziás szindróma* (MDS) klonális megbetegedés, amely kromoszómális instabilitással, a differenciálódási képesség csökkenésével és akut leukémiába történő átmenettel jellemezhető. A mielodiszpláziás megbetegedések száma évről évre emelkedő tendenciát mutat.

Az MDS-ek közös jellemzője, hogy nem képződik megfelelő számú normális sejt a csontvelőben. Ez vérszegénységhez, fertőzésekhez és nagyfokú vérzésekhez vezet. A

csontvelő rendszerint hipercelluláris, az éretlenebb mielopoetikus elemek felszaporodásával jellemezhető. Az betegség klinikai lefolyása változatos; az esetek egy része akut mieloid leukémiába (AML) transzformálódik, más része progresszív csontvelő-elégtelenséghez vezet.

A betegség tünetegyüttese szerteágazó, diagnózisa nem mindig egyértelmű, megerősítésében bizonyos kromoszóma-rendellenességek meghatározása (5⁻, 5q⁻, 7⁻, 7q⁻, 17q) fontos szerepet játszik (123). Az esetek 30-40%-ában nem tapasztalható citológiai eltérés. A betegség nyolc alcsoportra osztható a mielodiszplázia mértéke, az érintett sejtvonalak száma, a citogenetikai eltérések típusa és a blasztok %-os aránya alapján. Az MDS egyes altípusait a betegek várható élettartama és az akut leukémiává történő transzformáció valószínűsége alapján alacsony rizikójú („Refrakter Anaemia, Refrakter Anaemia Ringed Sideroblastokkal”) és magas rizikójú („Refrakter Anaemia Blastszaporulattal”, „Refrakter Cytopenia több sejtvonal dysplasiájával”) csoportokba lehet sorolni. (124)

Az MDS hátterében az irodalmi adatok alapján egy adott típusba sorolható progenitor sejtek abnormális proliferációja és fokozott apoptózisa áll (125, 126). Ennek köszönhető az érintett fejlődési irányhoz tartozó érett, funkcionális sejtek csökkent megjelenése a periférián.

A mielodiszpláziás tünetekkel rendelkező betegek csontvelői sejtjeinek felszínén megtalálhatók a funkcionálisan aktív, eritropoetint kötni képes Epo receptorok (127). Ennek ellenére a betegség általános tünete az Epo kezelésre csak ritkán reagáló anémia (128).

1.4.1.1 A TF-1 sejtvonal jellemzése

A TF-1 sejtvonal egy MDS alapon kialakuló mieloid leukémiás beteg csontvelőjéből származik. Morfológiailag éretlen eritroblaszthoz hasonlít, sejt felszíni markereit tekintve CD34⁺, CD33⁺, CD13⁺. A TF-1 sejtek növekedésükhöz és túlélésükhöz granulocita-makrofág-kolónia-stimuláló faktort (GM-CSF) vagy interleukin-3-at (IL-3) igényelnek. Mind eritroid, mind mieloid irányba differenciáltathatóak. A citokémiai jellemzők, a globin gének konstitutív expressziója, valamint a hemoglobin F indukálhatósága alapján ez a sejtvonal nagyon éretlen progenitor sejtől származhat (129). A TF-1 sejtek további jellegzetessége, hogy az Epo-receptor génje kromoszomális transzlokáció miatt sérült. Az Epo-R fehérje citoplazmatikus részéből 96 aminosav hiányzik és a sejtek ezt a rövid Epo receptor formát nagy mennyiségben expresszálják

(lásd 1.4. ábra) (37, 130). A hiányzó molekularésznek fontos jelközvetítő szerepe van a teljes hosszúságú Epo-receptor esetében. Így a TF-1 sejteken található Epo receptorok a 8 foszforilálható tirozinból csak kettőt tartalmaznak és az egyik közvetlen környezetében egy pont-mutáció is található (Leu347Pro csere)(131).

1.4.2 Mieloproliferatív rendellenességek

Mieloproliferatív szindróma (MPD) a gyűjtőneve négy krónikus lefolyású, összejt eredetű, klonális megbetegedésnek. Ezt a kóros állapotot a csontvelői progenitorsejtek túltermelődése jellemzi. A MPD betegségekből az éretlen előalakok fölös mennyiségben történő termelődése az érett forma számának a növekedéséhez vezet. A blasztos transzformáció a tumorsejtek klonális evolúciójának eredménye. Az egyes MPD altípusok elkülönítésében döntő szerepe van az adott kórképre jellemző genetikai eltérések meghatározásának. A krónikus mieloid leukémiára (CML) a *BCR-ABL*, krónikus eosinofil leukémiára a *FIPILI-PDGFR*A fúziós gének kialakulása jellemző. „Polycythaemia vera”-ban, krónikus idiopatiás mielofibrozisban és eszenciális trombocitemiában szenvedő betegek jelentős hányadában mutatható ki a *JAK2* gén pszeudokináz doménjében a V617F mutáció. Mindhárom génmutáció fokozott tirozin kináz aktivitáson keresztül vezet a hemopoetikus sejtvonalak proliferációjához (124, 132, 133).

1.4.2.1 A K562 sejtvonal és jellemzése

A K562 sejtvonalat egy 53 éves CML-ben szenvedő nő blasztos kríziséből származó leukémiából alapították. Ez az első immortalizált humán mieloid leukémia sejtvonal (Lozzio, 1979 #253}. A Philadelphia kromoszóma (t(9;22) transzlokáció) mellett még egyreciprok transzlokációt tartalmaz, amely a 15-ös kromoszóma hosszú karja és a 17 kromoszóma között jött létre (134). A K562 sejtek eritroid és megakariocita irányba is differenciálható leukémiás progenitoroknak feleltethetőek meg (135).

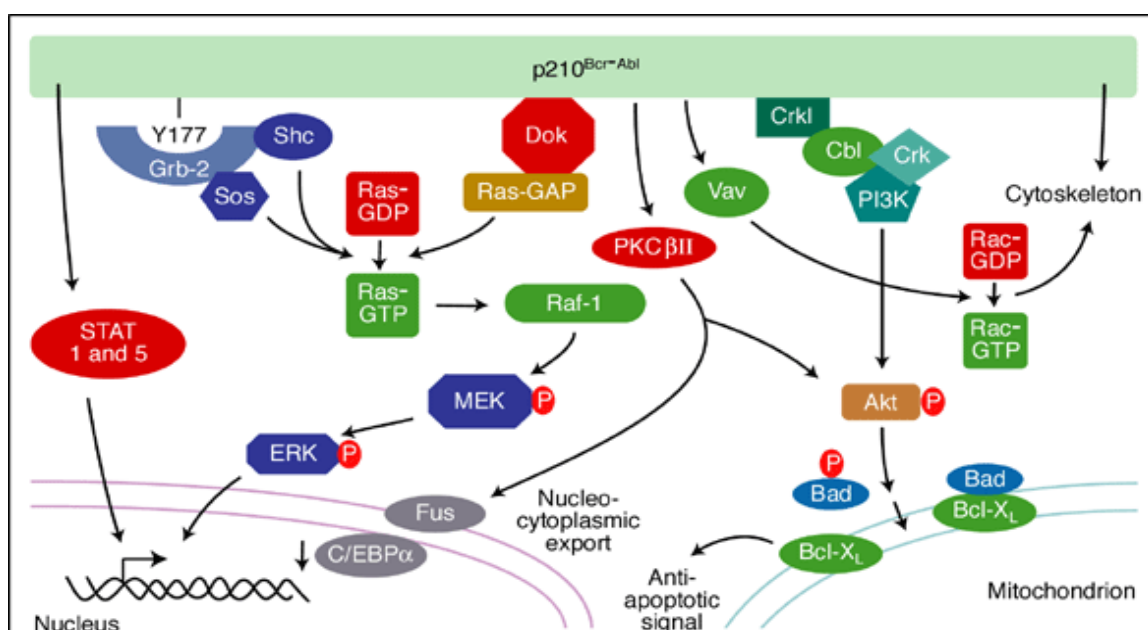
1.4.2.1.1 A Philadelphia kromoszóma és a Bcr-Abl fúziós fehérje

A krónikus mieloid leukémia (CML) kialakulásáért felelős molekuláris szintű eltérés a t(9;22) transzlokáció (Philadelphia kromoszóma) következtében kialakuló *BCR-ABL* fúziós gén, amely a betegek mintegy 95%-ában kimutatható és kulcsfontosságú eleme a CML diagnózisának és követésének (136). A *BCR-ABL* a 22-es kromoszómán található *BCR* (*b*reakpoint *c*luster *r*egion) gén és a 9-es kromoszómán elhelyezkedő *C-ABL* (*c*elluláris *A*belson) proto-onkogén fúziójával keletkezik.

A krónikus mieloid leukémiákra jellemző, hogy a Philadelphia kromoszóma valamely primitív hemopoetikus őssejtben alakul ki, így a betegség több hemopoetikus fejlődési irányt is érinthet. A *BCR-ABL* génről átíródó fúziós fehérje (p210) már jóval a blasztos transzformáció előtt, több progenitor sejttípusban is jelen van a csontvelőben. A Bcr-Abl fehérje konstitutív tirozin kináz aktivitása révén proliferációs előnyt biztosít a leukémiás sejteknek, valamint csökkenti azok apoptotikus stimulusokra való érzékenységet is. Mindezen folyamatok hátterében a Bcr-Abl által aktivált jelpályák permanens aktivációja áll. A Bcr-Abl fehérje auto-foszforilációja következtében, külső növekedési szignál független STAT5, Ras/Raf1/ MEK/ERK és PI3K aktivációt eredményez (137-139).

A CML a különböző kemoterápiás kezeléseknek, valamint a csontvelő transzplantációnak köszönhetően eredményesen kezelhető betegség, azonban a gyógyultnak tekinthető betegek aránya meglehetősen alacsony a kezelés toxicitásának, illetve a leukémia visszatérésének következtében. A Bcr-Abl farmakológiai gátlószere ma már a klinikumban széles körben használt gyógyszer (Gleevec, Glivec, CGP57148B, STI-571, imatinib-mesylate) (140). A Gleevec a Bcr-Abl kináz doménjének ATP-kötő zsebébe illeszkedik és azt zárt, inaktív konformációban stabilizálja (141, 142). Az utóbbi évek klinikai tapasztalatai alapján a Gleevec csak a betegség krónikus fázisában hatásos, az akcelerált illetve blasztos fázisban az elvárásokkal ellentétben alig, vagy csak nagy dózisban hatékony. A Gleevec említett molekuláris hatásmechanizmusa részben magyarázza a klinikai tapasztalatokat, hiszen a fehérje az osztódó sejtekben folyamatosan aktív, így csak kis valószínűséggel történhet meg az inaktív állapot stabilizálása. További probléma a Gleevec klinikai felhasználása során, hogy a kezelés gyakran nem jár együtt a kóros őssejtek eliminációjával és relapszusban számos esetben Gleevec rezisztencia alakul ki. Ennek hátterében az esetek 20%-ában BCR-ABL génduplikáció, míg 60%-ában BCR-ABL génmutáció áll (143). A betegség hatékony gyógyításához tehát újabb terápiás megközelítésekre van szükség, amelyhez elengedhetetlen a betegség patomechanizmusának pontosabb ismerete.

1.4.2.1.2 A Bcr-Abl fehérje által aktivált főbb jelátviteli útvonalak



1.7. ábra A Bcr-Abl fehérje által aktivált főbb jelátviteli útvonalak (Smith DL et al. 2003 Expert Rev Mol Med.(144) alapján)

A Bcr-Abl⁺ CML sejtekben a fúziós fehérje tirozin kináz aktivitása permanensen aktív (145), ez teszi lehetővé az ábrán szereplő jelpályák folyamatos aktivációját. A Bcr-Abl oligomerizációt és auto-foszforylációt követően veszi fel nyitott, aktív konformációját (146) és így lép kölcsönhatásba a szubsztrátjaival illetve a különböző adaptor fehérjékkel. Az utóbbi években robbanásszerűen megnőtt a Bcr-Abl által közvetített jelátviteli útvonalakra vonatkozó adatok száma. Az egyes kaszkádok és a résztvevő fehérjék pontos szerepe a leukemogenezis folyamatában azonban máig sem teljesen tisztázott, ahogyan a betegség során kialakuló blasztos transzformáció molekuláris háttere sem ismert.

A PI3-K/Akt útvonal aktiválódása esszenciális a Bcr-Abl⁺ sejtek osztódásához és túléléséhez (139, 147). A Bcr-Abl a Crk és Crkl adaptor fehérjék és a Cbl fehérje által képzett molekuláris komplexen keresztül aktiválja a PI-3 kinázt (148).

A Bcr-Abl fúziós fehérje számos mitogén útvonalat aktivál. A növekedéshez szükséges citokinek megvonása miatt a sejtciklus G0 fázisában megrekedt hemopoetikus progenitor sejtekben indukált Bcr-Abl expresszió elegendő a sejtciklust szabályozó ciklin dependens kinázok (CDK) aktiválásához és a sejt S fázisba lépéséhez. Ezzel egyidejűleg a Bcr-Abl a Ras fehérjén keresztül aktiválja a MAPK útvonalakat (138, 149).

A Bcr-Abl onkogén tirozin kináz mindezek alapján jól meghatározott funkciót tölt be a citokin függetlenné váló, korlátlan növekedési előny és az apoptózis-rezisztencia kialakulása során. A leukémiás transzformációra ugyanakkor az úgynevezett „kettős

csapás” elmélet alapján a differenciációs program sérülése ugyanúgy jellemző, mint a szabályozatlan sejtosztódás (150).

A Bcr-Abl fúziós fehérje differenciációt gátló funkciójának *in vitro* vizsgálatához megfelelő modellrendszer a CML eredetű *bcr-abl*⁺ K562 sejtvonal, amely különféle vegyületekkel (butirát, hemin vagy az anti-tumor ágensként használt ciszplatin és ara-C) eritroid irányba differenciáltatható. Ismert, hogy a pluripotens K562 sejtek Gleevec hatására ugyancsak eritroid irányba differenciálódnak, de a differenciáció mechanizmusa nem teljesen tisztázott (151). Nem ismert továbbá az sem, hogy a Gleevec kezelés révén előidézett eritroid differenciáció és apoptózis egymással milyen összefüggésben állnak, azaz K562 sejtek esetében szükségszerűen követi-e apoptózis az eritroid differenciáció eseményeit.

1.4.3 Akut leukémiák: a hemopoetikus progenitorok sejtosztódásának és differenciációjának klonális megbetegedései

A leukémiák a ma leginkább elfogadott nézet alapján egyetlen őssejtből alakulnak ki. A leukémiás őssejt immortalizálódik, folyamatosan önmegújító osztódásokat végez és válaszképtelenné válik a továbbra is jelen levő differenciációs ingerekre, valamint legtöbbször a programozott sejthalál szabályozása is sérül.

Az akut mieloid leukémia (AML) a mieloid prekursorok (blaszt sejtek) klonális proliferációjával jellemezhető. A blaszt sejtek eredete alapján nyolc típusba sorolhatóak az AML megbetegedések (M0-7), ahol a kórosan felszaporodott blaszt sejtek az érési tendencia hiányától kezdve az összes mieloid prekursor típust (granulocita, monocita, megakariocita és eritroid) képviselik. Az elmúlt évtizedekben egyedül a promielocitás típus kezelésében történt érdemi előrelépés az alapkutatásoknak köszönhetően, amely az ATRA (all trans retinoic acid) bevezetését jelentette a citosztatikumok kombinált kezelési kiegészítőjeként (152).

Kutatócsoportunk az eritroid differenciációhoz kapcsolható jelátviteli események vizsgálata során olyan mechanizmusokat keres, amelyek vizsgálati rendszertől függetlenül, általánosan érvényesek a fokozott hemoglobin tartalom megjelenésével jellemezhető differenciációra. Ezen jelátviteli eseményekbe való célzott (farmakológiai) beavatkozás alapja lehet olyan terápiás megközelítéseknek, amelyek bizonyos leukémiák differenciáció-indukált apoptózissal való elpusztításán alapulnak. A hemoglobin szintézis fokozódásához szükséges jelátviteli események felderítése mindemellett segítséget

nyújthat olyan súlyos vérszegénységgel jellemezhető betegségeknek gyógyításához is, ahol az eritropoetin hormon alkalmazása nem eredményes.

Doktori munkám során a hematopoetikus, ezen belül is kiemelten az eritrodifferenciáció jelátviteli mechanizmusának és a differenciáció-apoptózis kapcsolatának jobb megértésére törekedtem. Az általam is használt leukémiás sejtvonalak –mint a rosszindulatú betegségek modell sejtjei– intenzív kutatás célpontjai évtizedek óta. Az *in vitro*, különböző vegyületekkel a modellsejteken előidézett differenciáció, majd a rosszindulatú sejtek differenciáció-függő apoptózis révén való elpusztítása ma már a klinikumban széles körben használt terápiás megközelítés lett (150). A terminális differenciációra való elköteleződés és az azt követő programozott sejthalál folyamatának részletes megértése, mechanizmusainak molekuláris szintű megismerése fontos elméleti háttere a leukémiák ellen folytatott küzdelemnek és alapvető jelentőségű újabb, hatékony gyógymódok kifejlesztéséhez.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A felhasznált anyagok forrásai:

Humán rekombináns eritropoetin (hrEpo) Boehringer-Mannheim, GM-CSF (granulocita-makrofág-stimuláló faktor), MEK-1/2 gátlószer PD98059 és UO126 Cell Signalling Technology, PKC gátlószer BIM New England Biolabs, Ionomycin és A23187 ionofórok, ciklopiánsav (CPA), SERCA-pumpa-gátlók, PKC aktiválószer PMA (forbol-12-mirisztát-13-acetát) és minden más vegyszer, ahol nincs külön jelezve: Sigma.

A sejtvonalak, a sejtkultúra fenntartása és a kezelések körülményei:

A TF-1 hormon-függő, humán mieloid leukémia sejtvonalat Dr. C. Braun (Heinrich Pette Institute for Experimental Virology and Immunology Hamburg) bocsátotta rendelkezésünkre. Sejtvonalunkat sejtfelszíni markerek meghatározásával jellemeztük, anti- CD34, CD38, CD33, CD14, CD15, és GPA monoklonális ellenanyagokkal (Immunotech, Marseille), áramlási citofluorimetria segítségével. A TF-1 sejtvonalat 2,5 ng/ml hrGM-CSF jelenlétében nukleozid mentes RPMI médiumban tenyésztettük, amelyet 10% FCS-sel (fetal calf serum), 50 µg/ml streptomycinnel, 50 U/ml penicillinnel és 2 nM glutaminnal egészítettünk ki. A sejteket 5% CO₂ és 100% páratartalom mellett 37°C-os termosztátban tartottuk. Minden kísérlet előtt 16 órás GM-CSF megvonással szinkronizáltuk a sejteket és ezután kezeltük a következő anyagokkal: hrGM-CSF, hrEpo, ionomycin, CPA és PMA. A PKC klasszikus izoformáinak gátlására BIM-et használtunk. A MEK1 és MEK2 kinázok szelektív gátlószereit (PD98059 és UO126) használtuk az ERK1/2 aktiváció megakadályozásához.

A K562 sejteket nukleozidmentes RPMI 1640 médiumban növesztettük, amelyet 10% (v/v) FCS-sel, 2 mM glutaminnal, 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki (Gibco). A sejtszuspenziót 5% CO₂ és 100% páratartalom mellett 37°C-os termosztátban tartottuk. A kísérletek elvégzésekor a sejteket különböző sűrűségben (1x10⁵/ml sejt a differenciációhoz, 2x10⁵/ml sejt a szolubilis fehérje frakció preparátumhoz, illetve 4x10⁵/ml sejt a magi fehérje preparátumhoz) Petri csészékbe osztottuk, és dimetil-szulfoxidban (DMSO, Sigma) oldott Gleevec-kel (Bcr-Abl inhibitor, imatinib-mezilát, STI-571, Vichem) vagy UO126-tal (MEK1/2 inhibitor, 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bisz[2-aminofeniltio]butadién, Cell Signaling Technology) kezeltük.

Klinikai minták vizsgálata

A betegek diagnosztizálása a klinikus együttműködő partnerek által történt. Az eseteket perifériás vér és csontvelő morfológiai, citokémiai és citogenetikai vizsgálata alapján FAB (French American British) kritériumok alapján csoportosították. A csontvelő keneteket May-Grünwald-Giemsa szerint festették és a blasztok arányát százalékban adták meg. Citokémiai vizsgálatként POX(peroxidáz), PAS(perjódsvav-Schiff), α -naftil (nemspecifikus észteráz) és Sudan fekete festést alkalmaztak.

Kísérleteinkhez az Intézet Etikai Bizottsága által engedélyezett módon 3ml csontvelőt, vagy 20.000 feletti fehérvérsejt szám felett 5 ml perifériás vért használtunk, amelyek mononukleáris frakcióját Ficoll-Hypaque oldat segítségével, sűrűség alapján szeparáltuk.

A sejtszám és életképesség meghatározása

Az élő és az élettelen sejtek számát és az élő sejtek összes sejthez való arányát tripánkék (Sigma) kizárás alapján határoztuk meg sejtszámolással.

A sejtek lizálása és a fehérje preparátumok készítése

A különböző fehérje frakciók készítése a lizáló oldatok hozzáadásáig minden sejttípus esetében azonos módon történt. A Petri-csészékből a kezeléstől számított megfelelő idő elteltével 1000 g-n 5 percig centrifugáltuk a mintákat. A médium leöntése után 1,4 ml PBS-mix oldatban (PBS, 5 mM EDTA, 5 mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄) Eppendorf csövekbe vittük át a sejteket. Gyors centrifugálást követően a felülúszót gondosan eltávolítottuk.

A). Oldható fehérje frakció preparálása Western-blothoz

A fent leírt módon kapott üledéket, annak mennyiségétől függően 60-120 μ l lizáló oldattal felszuszpendáltuk, majd 10 percig jégen erősen rázattuk, amit 12 perc centrifugálás követett, 10000 g-n, 4°C-on. A felülúszót Eppendorf csövekbe vittük át és egyharmad térfogatnyi háromszoros töménységű mintafelvívő pufferben 5 percen át forraltuk, majd – 20°C-on tároltuk felhasználásig.

A lizáló oldat összetétele TF-1 sejteken végzett kísérleteknél: 250 mM NaCl, 50 mM HEPES-Na (pH 7,4), 1 mM EDTA-Na, 1mM EGTA-Na, 1,5 mM MgCl₂ , 0,1% Nonidet-P-40, proteáz inhibitorok: 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml

antipain, 10µg/ml pepsztatin és foszfatáz inhibitorok: 1 mM Na₃VO₄, 10 mM benzamidin, 20 mM NaF, 1 mM PMSF és 40 mM β-glicerofoszfát.

A lizáló oldat összetétele K562 sejteken végzett kísérletek esetében: 250 mM NaCl, 50 mM TRIS-HCl (pH=7,4), 1 mM EDTA-Na, 1 mM EGTA-Na, 1,5 mM MgCl₂, 1% Nonidet-P40, foszfatáz inhibitorok: 40 mM β-glicerofoszfát, 20 mM NaF, 1 mM para-nitro-fenil-foszfát, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM nátrium-pirofoszfát, 1 mM PMSF valamint proteáz inhibitorok: 10 mM benzamidin, 10 µg/ml antipain, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepsztatin.

A *mintafelvívő puffer* összetétele: 20% SDS, 10% glicerin, 0,1 M EDTA (pH 7,4), 1 M Tris (pH 7,0), 1 M β-merkaptotetanol, 1% brómfenol-kék, 0,1 M DTT

B). Magi fehérjék preparálása

A PBS-mix eltávolítása után kapott üledékhez 500 µl puffer A-t adtunk és óvatosan felfuszpendáltuk, majd 15 percig jégen állni hagytuk. A kis ionerőn a sejtek megduzzadtak, a redukáló közeg, valamint a proteáz és foszfatáz inhibitorok a fehérjéket védték a lebomlástól. Ezt követően 5 µl 10 % Nonidet P-40 oldatot adtunk a mintákhoz, és erőteljesen ráztunk 10 másodpercig jégen, majd 4°C-on, 800 g-n 5 percig centrifugáltuk. Így zömében intakt sejtmagokat kaptunk az üledékben. A csapadékot mennyiségétől függően 30-50 µl puffer C-ben vettük fel, majd 4°C-on 15 percig ráztunk, hogy a magas ionerő hatására a DNS-re kötött fehérjék az oldatba kerüljenek. 10 000 g-n 4 °C-on 10perc centrifugálás után a felülúszót -80 °C-on tároltuk.

A *puffer A* összetétele: 10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 10 µg/ml antipain, 1 mM Na₃VO₄.

A *puffer C* összetétele: 20 mM HEPES (pH 7,9), 0,4 M NaCl, 1mM EDTA (pH 0,8), 1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 10µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 10µg/ml antipain, 1 mM Na₃VO₄ és 10% glicerin.

A fehérje mennyiségét minden esetben módosított Lowry módszerrel határoztuk meg.

A minták fehérjetartalmának meghatározása módosított Lowry-módszerrel

A sejtlizátumok azonos mennyiségeit (2,5 µl) 2%-os DOC (deoxi-kólsav), Sigma-Aldrich) oldatban való inkubációt követően 25%-os TCA (triklór-ecetsav, Sigma) oldattal

lecsaptuk, majd a mintákat 4°C-on 4000 rpm-en 45 percig centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a triklór-ecetsavval kicsapott fehérjét 1,5 ml A reagensben vettük fel (az A reagens összetétele: 0,1 M NaOH, 0,19 M Na₂CO₃), amelyet előzőleg 1% (v/v) 2%-os nátrium-tartarát oldattal, valamint 1% (v/v) 1%-os réz-szulfát oldattal egészítettünk ki. Végül 30-szorosra hígított Folin reagens (Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma) hozzáadását követően 30 perc elteltével 660 nm-en mértük a minták abszorbanciáját.

Western-blot analízis:

Mintánként 70µg fehérjét SDS-PAGE módszerrel választottunk szét, majd PVDF membránra vittük át Mini-Protean II készülék (Bio-Rad) segítségével.

A keresett fehérjék kimutatása antigén-antitest reakció alapján

TBS-Tween oldat összetétele: 25 mM TRIS-OH, 0,2 M NaCl, 0,1 % Tween 20 (Sigma)

A fehérjetranszfert követően a membránokat az aspecifikus kötődések csökkentése céljából 5 % sovány tejport tartalmazó TBS-Tween oldatban inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 órán át. Az elsődleges ellenanyagokat TBS-Tween 5% BSA oldatban hígítottuk 1µg/ml végkoncentrációra. A membránokat éjszakán át 4°C-on forgattuk az ellenanyagot tartalmazó oldatban, majd TBS-Tween oldattal mostuk. Ezt követően a membránokat HRP (*horse radish peroxidase*) 5000-szeres hígítású oldatában inkubáltuk szoba-hőmérsékleten 1 órán át. A másodlagos ellenanyag feleslegét TBS-Tween oldattal mostuk le a membránokról.

A következő ellenanyagokat használtuk az immunfestéshez:

Poliklonális ellenanyagok: anti-(**c-Abl**) H-300 sc-13076 Santa Cruz, anti-(**ERK1**)(C-16, sc-93), anti-(**STAT5A/B**) Santa Cruz 10x , anti-(**Bcl-xL**) Santa Cruz, anti-(**Bcl-2**) DC21 sc-783 Santa Cruz, anti-(**Egr-1**) Santa Cruz, anti-(**c-Fos**) Santa Cruz

Monoklonális ellenanyagok: anti-(**foszfo-STAT5A/B**) clone 8-5-2 Upstate, anti-(**foszfo-ERK**) E-4 sc-7383 Santa Cruz, anti-(**foszfo-tirozin**) 4G10 klón Upstate, anti-(**PARP**) #AM30 Oncogene, anti-(**p-Elk-1**) B-4 sc-8406 Santa Cruz monoklonális ellenanyagok.

Másodlagos ellenanyagként nyúl-, egér- valamint patkány IgG HRP konjugált (Jackson és Cellular Signaling Technology) másodlagos ellenanyagokat használtunk 5-10 000-szeres hígításban. A fehérjekomplexeiket Amersham ECL (enhanced chemi-luminescence) kittel tettük láthatóvá. A membránokat először a monoklonális ellenanyagokkal festettük, majd

az eredmények jobb összehasonlíthatósága érdekében minden membránt immunfestettünk egy másik ellenanyaggal is, amelynek mennyisége a kezelések során nem változik. A mi rendszerünkben erre alkalmas volt az ERK 1/2 fehérjék ellen termeltetett poliklonális ellenanyag. A Western blotok szemi-kvantitatív értékeléséhez a RTG-filmeket BioRad géldokumentációs rendszerrel értékeltük ki, és a denzitometráláshoz Bioscan v 4.0 software-t használtunk. Mivel ugyanazon membránt többfajta ellenanyaggal is előhívtunk, a másodlagos ellenanyagok jelét a HRP enzim tönkretételével szüntettük meg, szobahőn 30 percen át tartó 0,05% hidrogén-peroxid tartalmú TBS-Tween oldatban való inkubálással. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagok teljes eltávolítását antitestetlennítéssel végeztük: 50°C-on 30 percen át rázattuk a membránokat 62,5mM Tris pH 6,7, 100mM β merkaptotanol, 2% SDS összetételű oldatban.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA):

Ezzel az eljárással transzkripciós faktorok specifikus, ismert szekvenciájú DNS darabokhoz való kötődését vizsgáltuk. A kereskedelmi forgalomban kapható kétszálú (ds) DNS oligonukleotidokból egyenként 30 pmol mennyiséget 10 Unit T4 kináz (Amersham E. Coli B) és 20 μ Ci [γ -³²P] dATP felhasználásával (4500 Ci/mmol, Izotóp Intézet) 37°C-on 15 perces reakció során 5' végén ³²P-ral jelöltük. A reakciót 0,05M EDTA-Na pH 8,0 oldattal állítottuk le. Ezt követően Sephadex G25 oszlopon elválasztottuk egymástól a szabad és az oligonukleotidhoz kötött [γ -³²P] dATP-t. A gél-shift analízisekhez minden jelölésből a legtisztább, azaz legkorábban eluálódó nagy beütésszámú frakciókat használtuk fel. A frakciók beütés-számát béta-számláló berendezéssel állapítottuk meg, majd azt követően a kiválasztott frakciókat felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az általunk vizsgált összes konszenzus oligonukleotidokat a Santa Cruz gyártotta.

A gél-shift analíziseket a korábban már publikált módon végeztük (153). Minden EMSA reakcióhoz azonos mennyiségű fehérjét használtunk fel, melyet a magi fehérje preparátumok módosított Lowry (azaz TCA-s lecsapáson alapuló) fehérje meghatározási módszerrel kapott adataiból számoltunk. A különféle jelölt oligonukleotidok esetén az EMSA reakciókhoz 7 μ g magi fehérje lizátumot használtunk fel. Emellett a mintánként egyenlő térfogatokra beállított EMSA reakció elegyek a következőket tartalmazták: 5% glicerin, 1mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 0,5mM DTT, 10mM Tris pH 7,6, 1 μ g poly(dI-dC) Amersham. A komplexek kialakulása után (20 perc szobahő) a reakciókhoz 10x tömény EMSA felvivő puffert adtunk, majd alaposan összeszuszpendáltunk minden egyes reakcióelegyet. A felvivő puffer összetétele a következő volt: 0,25% brómfenol kék,

0,25% xylene-cyanol, 50% glicerín. Ezt követően a mintákat 5%-os, nem denaturáló gélen (a futtató puffer összetétele: 45mM Tris-borát és 1mM EDTA pH 8,0) elektroforetizáltuk, így szétválasztottuk a kis molekulatömegű szabad DNS-szakaszokat a (lassabban vándorló) fehérjéhez kötött DNS-től. A kötődés specifikusságát nagy mennyiségű (200-szoros feleslegben adott) „hideg” oligonukleotid hozzáadásával ellenőriztük. A futtatást követően a geleket 3M Whatmann papírra szárítottuk BioRad gélzártó rendszer segítségével. A fehérje – DNS oligonukleotid komplexek detektálását autoradiográfián végeztük.

Kaspáz-3 aktivitás mérése:

3×10^6 hormon-megvonással szinkronizált TF-1 sejtet különböző anyagokkal kezeltünk, majd fagyasztás-olvasztásos módszerrel lizáltuk a következő összetételű oldatban: 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 50 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM β -merkaptó-etanol, 0,4 % Nonidet P-40, 2 mM PMSF, 100 μ M Na_3VO_4 , 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin és 10 μ g/ml antipain. Az így kapott minták fehérje tartalmát Bradford (Sigma) reagenssel határoztuk meg. Mintánként 50 μ g fehérjét használtunk a kaspáz-3 aktivitás mérésére. A minták végtérfogatót 100 μ l-re állítottuk be egy 10 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 % szukróz, 1 mM DTT, 0,025 % CHAPS tartalmú oldattal, amely 50 μ M Ac-DEVD-AMC (acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilkumarin) szubsztrátot is tartalmazott. Az AMC felszabadulást fluorimetrián (360 nm gerjesztő és 460 nm emissziós hullámhosszon) mértük az idő függvényében. A felszabaduló AMC koncentrációját fluoreszcencia intenzitásból számítottuk kalibrációs görbe segítségével. A minták kaspáz-3 aktivitását a GM-CSF megvonással szinkronizált sejtek aktivitásához viszonyítottuk.

DNS létra kimutatása:

5×10^6 sejtől a teljes celluláris DNS-t a proteináz K-fenol:kloroform:izoamilalkoholos módszerrel nyertük ki (154), majd 1,8%-os etidium-bromid tartalmú agaróz gélen megfuttattuk és lefényképeztük.

Hemoglobin fehérje tartalom meghatározása

A stimulációtól számított 72 óra elteltével meghatároztuk a sejtszámot, majd a mintákat 800 g-n 5 percig centrifugáltuk és Eppendorf csövekbe vittük át és annyi PBS-1% Nonidet-P40 oldatban vettük fel, hogy a sejtsűrűség minden minta esetén 10^5 sejt/ μ l legyen. Szonikálást követően a mintákat 4°C-on 11000 g-n 30 percig centrifugáltuk. A felülúszók 25-25 μ l-éhez 100 μ l 1%-os benzidinoldatot (benzidin szabad bázis 90%-os ecetsavban oldva), valamint 100 μ l 1%-os hidrogén-peroxid oldatot adtunk. 20 perc elteltével a mintákhoz 1 ml 10%-os ecetsavat adtunk, majd 512 nm-en leolvastuk az abszorbancia értékeket. Az egyes minták hemoglobin tartalmát ismert koncentrációjú szarvasmarha hemoglobin oldatok segítségével határoztuk meg.

Kvantitatív real-time PCR

A mintákból totál RNS preparátumokat készítettük TRIZOL reagens (Invitrogen) segítségével a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Mintánként 1 μ g denaturált RNS-t random hexamer primerek segítségével cDNS-sé írtunk át. A reverz transzkripciót a következő, 20 μ l végtérfogatú reakcióelegyben végeztük: a megfelelő pufferben 200 unit MMLV (Moloney murine leukemia virus) reverz transzkriptáz, 40 unit Rnáz inhibitor 0,5 mM dNTP és 100 ng random hexamer primer (Promega).

A relatív mRNS mennyiség kvantifikálásához a LightCycler rendszert használtuk (Roche). Mintánként 1 μ l totál celluláris cDNS-t amplifikáltunk LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) segítségével 2mM $MgCl_2$ és 0,5 μ M megfelelő primer jelenlétében. A globin génre specifikus primereket úgy terveztük (DNASTAR), hogy kizárólag a β -globin gén cluster elemeit ismerjék fel. Kontrollként β 2-mikroglobulin (B2M) gént használtuk, amely expressziója a vizsgált időintervallumban változatlan.

A felhasznált primerek:

Hs-globinF: 5'-TACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTT-3'

Hs-globinR: 5'-CCCAGGAGCCTGAAGTTCTC-3'

B2M-ex1F: 5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3'

B2M-ex3R: 5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3'..

Az egyes mintákban található relatív mRNS mennyiségeket a LightCycler szoftver segítségével határoztuk meg.

A Bcr/Abl fúziós fehérje csendesítését szolgáló retrovirális kis inhibítoros RNS (shRNS) konstrukció és a nonszensz (nemkódoló) kontroll létrehozása

A kísérleteinkhez felhasznált retrovirális konstrukciókat kereskedelmi forgalomban kapható különböző vektorokból, valamint kémiai úton szintetizált DNS-szekvenciákból építettük fel. Célunk a kis inhibítoros RNS darabok stabil, hosszú távú expresszáltatása volt K562 sejtekben. A retrovirális konstrukció elvi felépítése a következő volt: riporter génként a pLPCX retrovirális vektor multiklónozó helyére (MCS) zöld fluoreszcens fehérjét építettünk be (EGFP enhanced green fluorescent protein), melyet a pEGFP-N1 plazmidből (BD Biosciences, Balla Tamás ajándéka) szaporítottunk fel és vágunk ki. Az *EGFP* gén átíródása a vírus promóterről (LTR) történt. A retrovirális konstrukció szelekciós markerként puromycin rezisztencia gént tartalmazott. A kis inhibítoros RNS-ek képződéséhez szükséges DNS templátot az Ambion p*Silencer* 3.1 vektorból vett H1 promóter működtette. A humán H1 promóterről az RNS polimeráz III írta át az siRNS-eket.

A *Bcr/Abl* fúziós gén csendesítését célzó siRNS templát szekvenciát Li et al. Li MJ et al.; 2003. *Oligonucleotides* **13**, 401-409 alapján határoztuk meg és kémiai úton szintetizáltattuk (Sigma). Aspecifikus kontrollként az Ambion p*Silencer* 3.1 vektorban található (Ambion) eredeti nemkódoló siRNS szekvenciát használtuk fel. A „H1-kis inhibítoros RNS-hajtú (shRNS) templát” konstrukciót az Ambion p*Silencer* 3.1 vektorból egy olyan primerpár segítségével amplifikáltuk, melyet a gyártó a szekvenáláshoz ajánl. A felszaporítást úgy végeztük, hogy közben AgeI restrikciós enzim hasítási helyeket építettünk be a konstrukció két végén, azért hogy lehetővé tegyük a retrovirális vektorba való beillesztést. A felszaporított, majd szekvenálással visszaellenőrzött „H1-kis inhibítoros RNS-hajtú (shRNS) templát” expressziós kazettákat a pLPCX retrovirális vektorba építettük be (Geiszt Miklós ajándéka), a virális pakoló szignál és a puromycin rezisztencia gének közé, ahol a promóter interferencia minimális. Az általunk beépített, inverz ismétlődéseket tartalmazó DNS szakaszról a H1 promóter dupla szálú RNS-ek átíródását teszi lehetővé, melyekből kis, hajtú-szerű struktúrával rendelkező RNS-ek képződnek (shRNS). Ezt a DICER nevű enzimkomplex elhasítja, így egy olyan RNS duplex jön létre (small interfering RNA), melyet a RISC (RNA Induced Silencing Complex) enzimkomplex felismer, hatására aktiválódik és a szekvencia-specifikus cél-mRNS-t ennek következtében elhasítja. Ily módon az általunk vizsgált fehérje mRNS-e degradálódik, ami a fehérjeszint csökkenéséhez vezet.

Az elkészült konstrukcióból (155) által publikált módszerrel hoztuk létre a fertőzőképes vírusokat. A módszer lényege a következő: E.coliban felszaporított, majd tisztított vektor DNS-sel kalcium foszfátos ko-precipitációval Phoenix-eco sejteket fertőztünk, majd az így kapott a vírusfelülűszóval PG13 pakoló sejteket fertőztünk, melyeket ezután 4.5 µg/ml puromycinnel szelektáltunk. A sejtmentes vírusfelülűszóval ezután K562 sejteket fertőztünk, amelyeket a transzdukciót követő harmadik naptól 1,5 µg/ml puromycinnel szelektáltunk.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja olyan jelátviteli útvonalak eritroid differenciációban betöltött szerepének vizsgálata volt, amelyek jól ismert funkciója a túlélés és a sejtosztódás elősegítése. Kísérleteink megtervezésekor kiemelt hangsúlyt fektettünk az ERK1/2 mitogén aktivált kinázok szerepének meghatározására, mivel egyre több irodalmi adat utal arra, hogy az említett kinázok aktivitásának mértéke és időbeli lefutása alapvetően meghatározhatja a sejtválaszt.

A dolgozatban bemutatott kísérletek során különböző mieloid leukémia sejtmodelleket használtunk, amelyek eritroid irányú differenciációja során az általunk vizsgált jelátviteli útvonalak szerepe nem kellő képpen tisztázott. Mindezek mellett összefüggéseket kerestünk citokin stimulus hatására aktiválódó, sejtosztódáshoz kapcsolható jelátviteli útvonalak normálistól eltérő működése és a mielodiszplázia kialakulása között, valamint a vizsgált útvonalak aktiválhatósága és az MDS akut leukémiává történő transzformációja között klinikai minták vizsgálatával.

3.1. A sejtosztódáshoz és túléléshez kapcsolható jelpályák elkülönítése az Epo-receptor közvetített, eritroid differenciációhoz vezető jelátviteli eseményektől TF-1 sejtekben

Az általunk vizsgált humán TF-1 sejtvonal olyan GM-CSF vagy IL-3 citokin-függő, korai multipotens progenitor leukémiás transzformációja során jött létre, amely eritroid, megakariocita, monocita/ganulocita és mieloid dendritikus sejt irányú differenciációra egyaránt képes. A TF-1 sejtek által nagy mennyiségben expresszált Epo receptor C-terminális citoplazmatikus doménje 96 aminosavval megrövidült. A hiányzó molekularésznek fontos jelközvetítő szerepe van a teljes hosszúságú Epo receptor esetében. Ismert, hogy a teljes hosszúságú receptor a megfelelő eritroid sejthalakok növekedését, túlélését és differenciációját egyidejűleg biztosítja. Az előbb említett fiziológiás válaszokhoz tartozó jelátviteli események azonban nem tisztázottak. A TF-1 sejtvonal mindezek alapján egy olyan egyedülálló humán modellrendszer, amely alkalmas a GM-CSF-receptor közvetített, túléléshez és önmegújító sejtosztódásokhoz kapcsolható jelátviteli események és az Epo-indukált, eritroid differenciációt eredményező intracelluláris folyamatok egymástól való elkülönítésére.

- TF-1 sejteken végzett kísérleteink elsődleges célja az I-es típusú citokin receptorok (GM-CSF-R, Epo-R) által aktivált –elsősorban túléléshez és sejtosztódáshoz kapcsolható- jelátviteli útvonalak eritroid differenciációt szabályozó szerepének vizsgálata volt. Munkánk során jól ismert mitogén jelátviteli útvonalak -mint a Raf/MEK/ERK/Elk-1 MAPK kaszkád vagy a JAK-2/STAT-5 útvonal- aktivitását, valamint a c-Fos/AP-1, Egr-1, c-Myb és NF- κ B transzkripciós faktorok DNS-kötő képességét vizsgáltuk TF-1 sejtek önnfentartó osztódásai, valamint Epo-indukált eritroid differenciációja során.

- Mivel a TF-1 sejtek rövid Epo receptora egy pontmutáció következtében a STAT-5 aktivációra nem képes, működési mechanizmusát tekintve megegyezik a fiziológiásan létező, legkorábbi eritroid sejthalakokra jellemző rövid Epo receptorral. A GM-CSF-R és az Epo-R-függő jelátviteli események összehasonlításával arra törekedtünk, hogy az eritroid irányú elköteleződést elsődlegesen irányító rövid Epo receptorforma működésének molekuláris hátterét jobban megismerjük.

3.2 Az intracelluláris szabad $[Ca^{2+}]$ megemelkedése által aktivált jelpályák hatása TF-1 sejtek differenciációjára, túlélésére illetve proliferációjára

Kutatócsoportunk korábban megállapította, hogy a citoplazmatikus szabad kalcium koncentráció farmakológiai úton előidézett emelése önmagában elegendő a hemoglobin-képződés fokozásához CFU-E progenitor érettségi szinten megrekedt, Epo-szenzitív -azaz eritropoetin hatására differenciációra képes- eritroleukémia sejtekben (ELMI-1 MEL), valamint eritropoetin hatására differenciációra már nem képes eritroleukémia sejtek esetében (F4-6 MEL) egyaránt. Az említett sejttípusok esetében a differenciáció minden esetben -vagyis az indukció módjától és a vizsgált sejttípustól függetlenül- együtt járt a c-Myb proto-onkogén transzkripciós faktor mRNS szintjének gyors, átmeneti csökkenésével.

- Mindezek alapján tovább vizsgáltuk, hogy a c-Myb expresszió-csökkenéshez hasonlóan létezhet-e az eritroid irányú differenciációnak, illetve elköteleződésnek egyéb olyan univerzális mechanizmusa, amely független az alkalmazott sejttípustól és a differenciáció indukció módjától?

- A korai multipotens progenitornak megfeleltethető humán TF-1 leukémia sejtekben ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogy előidézhető-e a $[Ca^{2+}]_i$ megemelésével az eritroid irányú differenciáció?

Előzetes eredményeink alapján a farmakológiailag előidézett $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés nem fokozza TF-1 sejtek hemoglobin szintézisét, ugyanakkor gátolja a hormonmegvonás következtében kialakult apoptózist.

- További kísérleteink során így választ kerestünk arra, hogy a farmakológiai úton előidézett $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés milyen mitogén és túlélési útvonalakat aktivál TF-1 sejtekben, valamint azok hogyan befolyásolják az eritropoetinnel előidézett differenciációt?

3.3. Citokin-receptor közvetített jelpályák normálistól eltérő aktivitásának vizsgálata mielodiszplázia esetén és az MDS akut limfoid leukémiává történő blasztos transzformációját követően

A mielodiszpláziás tünetekkel rendelkező betegek csontvelői sejtjeinek felszínén megtalálhatók a funkcionálisan aktív Epo receptor fehérjék (127). Ennek ellenére a betegség általános tünete az Epo kezelésre nem, vagy alig reagáló anémia (128). Feltételezhető, hogy a mielodiszpláziás szindrómák hátterében az EpoR jelátvivő rendszerének zavara áll.

Az itt bemutatott munka során összefüggéseket kerestünk citokin stimulus hatására aktiválódó, sejtosztódáshoz kapcsolható jelátviteli útvonalak normálistól eltérő működése és a mielodiszplázia kialakulása között, valamint a vizsgált útvonalak aktiválhatósága és az MDS akut leukémiává történő transzformációja között.

- Elsődleges célunk az Epo-receptor jelátvitel egyes kulcs komponenseinek –az ERK1/2 kinázok és a STAT-5 transzkripció faktor- vizsgálata volt MDS RA betegek csontvelői mononukleáris sejt mintáiban. Egészséges sejtpopulációkkal, valamint a GM-CSF citokin stimulusra adott válaszokkal összehasonlítva az általunk tanulmányozott útvonalak normálistól való eltéréseinek megfigyelésére törekedtünk, amely hozzásegíthet a betegség patomechanizmusának felderítéséhez.

Az MDS/AML transzformáció kialakulásakor a növekedési hormonok szabályozása alól kikerülő funkcionálisan éretlen sejtek megjelenése és felhalmozódása sok esetben visszavezethető egyes mitogén szignálutak permanens aktivációjára.

- Munkánk során ezért célul tűztük egyes sejtosztódáshoz kapcsolható jelpályák Epo illetve GM-CSF citokin stimulációra adott válaszában követését az MDS akut leukémiává való transzformációját követően. Ennek megfelelően vizsgáltuk a STAT-5 transzkripció faktor aktivitását, valamint a c-Fos és az Egr-1 fehérjék mennyiségét és az AP-1

transzkripciós faktor DNS-kötését. Az MDS és az akut leukémiák citokin-stimulusra adott válaszána összehasonlítása hozzásegíthet a blasztos transzformáció molekuláris hátterének megértéséhez. Egészséges sejtpopulációkkal való összehasonlítás révén az általunk tanulmányozott útvonalak normálistól való eltéréseinek megfigyelése mindemellett hozzásegíthet olyan kiegészítő diagnosztikai eljárások kifejlesztéséhez, amelyek megkönnyítik az MDS felismerését és akut leukémiáktól kezdeti szakaszától való elkülönítését.

3.4. A Bcr-Abl fúziós fehérje által közvetített sejtosztódáshoz és túléléshez kapcsolható jelpályák aktivitásában bekövetkező változások szerepének vizsgálata K562 krónikus mieloid leukémia eredetű sejtvonal eritroid differenciációja során.

A K562 sejtvonal Philadelphia kromoszóma pozitív krónikus mieloid leukémia blasztos transzformációja során létrejött humán eritroleukémia sejtvonal. Különféle kémiai indukálószer hatása eritroid és megakariocita irányú differenciációra képes.

- Munkánk során a betegség kialakulásával egyértelmű összefüggésben álló, konstitutív aktivitással jellemezhető Bcr-Abl fúziós tirozin kináz fehérje és az általa aktivált mitogén jelpályák eritroid differenciációban betöltött szerepét vizsgáltuk farmakológiai gátlószer, valamint a Bcr-Abl fúziós fehérje mennyiségének shRNS-mediált csendesítése segítségével.

- Kiemelt célunk volt továbbá annak megállapítása, hogy a különféle stimulus hatására az egyes mitogén útvonalak egyensúlyi aktivitásában bekövetkező időbeli változások milyen összefüggésben állnak a differenciációval (azaz γ -globin expresszió fokozódással) illetve a sejtek önfenntartó osztódásával és apoptózisával.

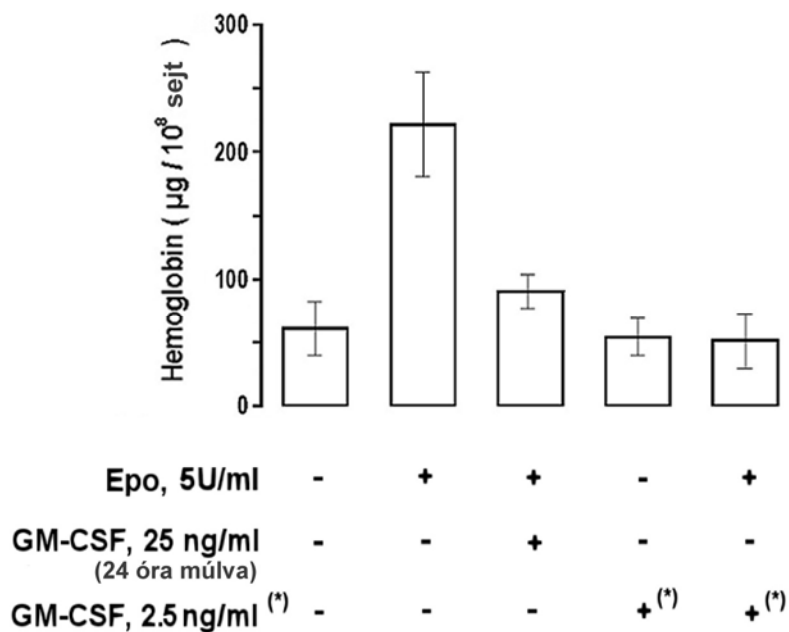
4. EREDMÉNYEK

4.1 Az eritroid differenciációhoz, sejtosztódáshoz és túléléshez kapcsolható jelpályák egymástól való elkülönítése TF-1 sejtekben

Előzetes megfigyeléseink alapján a tenyészetben (2,5 ng/ml GM-CSF-ben) növvő TF-1 sejtek eritropoetin hatására nem differenciálódnak. Ezzel szemben a sejtek érzékenysége válnak az Epo stimulusra –azaz az Epo a hemoglobin tartalom szignifikáns emelkedését eredményezi-, amennyiben a sejteket a stimulust megelőzően 16 órán át GM-CSF-, tenyésztőfolyadékban növesztjük. E megfigyelés alapján, a tenyésztési folyamat során aktiválódott jelpályák hatásának kiküszöbölése céljából, a TF-1 sejteket minden kísérlet kezdete előtt egy éjszakán át (16 órán keresztül) GM-CSF-mentes, komplett RPMI médiumban tartottuk. A hormonmegvonás hatására a sejtek 50-60%-ban a sejtciklus G0/G1 fázisában halmozódtak fel és a vizsgált mitogén jelpályák aktivitása a kimutathatóság határa alá csökkent (lásd Apati A et al. JBC 278:9235-43; 2.ábra)(156).

4.1.1 A GM-CSF növekedési hormon hatása az eritropoetin indukált hemoglobin szintézisre TF-1 sejtekben

Az 1. ábrán bemutatott kísérleteink során a hormonmegvonással szinkronizált TF-1 sejteket, valamint a kontroll sejtenyészetet 5 U/ml Epo hormonnal kezeltük. 72 órával a kezeléseket követően sejtlizátumokat készítettünk, majd benzidines festéssel meghatároztuk a minták hemoglobin tartalmát. Az eritropoetin TF-1 sejtek esetében maximálisan a kiindulási szint közel ötszörösére képes megemelni a hemoglobin fehérje mennyiségét (4.1.ábra). 2,5 ng/ml GM-CSF jelenlétében az Epo-val előidézhető hemoglobin-termelés elmaradt (4.1. ábra 2.oszlop vs 4.oszlop). A GM-CSF abban az esetben is gátolta a hemoglobin szint emelkedését, ha az Epo indukciót követően 24 órával adtuk a mintákhoz (4.1. ábra 2. vs 3. oszlop). Tehát a GM-CSF TF-1 sejtek esetében minden körülmények között gátolja az Epo-val előidézhető differenciációt: abban az esetben is, ha a GM-CSF jelenlétében tenyésztett minták esetén történik az Epo stimulus, valamint akkor is ha a differenciációs folyamatok már elindultak (azaz a differenciáció indukciót követően adva is).



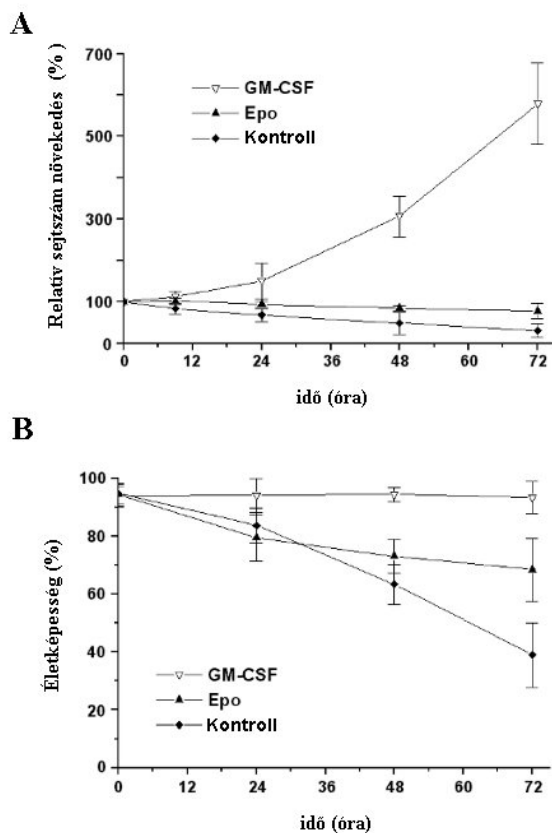
4.1. ábra TF-1 sejtek hemoglobin tartalma 72 órával a különféle citokin stimulusokat követően.

TF-1 sejteket 16 órán át GM-CSF-mentes médiumban tartottunk, majd ezt követően Epo-val stimuláltuk (2.,3. és 5. oszlop), 24 órával az Epo stimulust követően GM-CSF-et adtunk az Epo-val kezelt mintákhoz (3. oszlop). A 4. oszlopban a tenyészet hemoglobin tartalma látható, az 5. oszlop a kontroll tenyészethez adott Epo hatását mutatja.

4.1.2 TF-1 sejtek proliferációja és életképessége az eritropoetin indukált eritroid differenciáció során

Az előzőekben bemutatott eredmények alapján a TF-1 sejtek kizárólag abban az esetben differenciálódnak eritropoetin hatására, amikor a GM-CSF nincs jelen. További kísérleteink annak megállapítására irányultak, hogy a differenciáció indukciója mellett hogyan befolyásolja az eritropoetin TF-1 sejtek GM-CSF hiányában tapasztalható életképességét illetve a sejtosztódást.

A 16 órás hormonmegvonást követően TF-1 sejteket 5 U/ml Epo vagy 2.5ng/ml GM-CSF citokinnel stimuláltuk és az azt követő 72 órában tripánkék-kizárásos módszerrel követtük a sejtszám változását. Az élő sejtek arányát a kísérlet kezdetekor számolt érték %-ában kifejezve adtuk meg (4.2.ábra/A).



4.2 ábra sejtszám (A) és az életképesség (B) változása a GM-CSF és az Epo hormonnal kezelt, illetve a kontroll sejtekben.

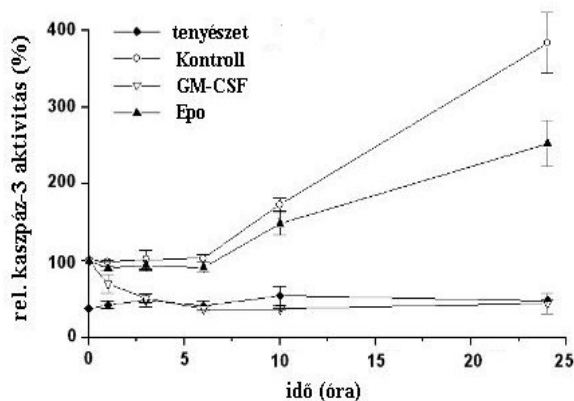
16 óra GM-CSF megvonás után (kiindulási időpont) a TF-1 sejteket a következő anyagokkal kezeltük: 2,5 ng/ml GM-CSF és 5 U/ml Epo. A sejtszám változásokat tripán-kék kizárásos módszerrel határoztuk meg. A sejtszám növekedést a kiindulási sejtszámmra (100%) vonatkoztattuk. Az életképesség az élő/összes sejt arányát tükrözi százalékban kifejezve. Az adatok 3 független kísérlet eredményét tükrözik.

Vizsgálataink alapján a GM-CSF visszaadása a hormonmegvonást követően exponenciális növekedést indukál TF-1 sejtekben. Ugyanilyen körülmények között az eritropoetin kezelés nem eredményez sejtosztódást és a 72 órás vizsgálati időtartam alatt a kezeltlen kontroll sejtekhez hasonlóan a sejtszám fokozatos csökkenéséhez vezet. A továbbiakban tripánkék-kizárásos festésen alapuló sejtszám adatokból meghatároztuk a sejtek életképességét, azaz az élő/összes sejt arányt. A kapott arányszámokat a kiindulási érték %-ában ábrázoltuk (4.2/B ábra). Eredményeink alapján GM-CSF hiányában a TF-1 sejtek folyamatosan pusztulnak, amelyet az eritropoetin kezelés nem tud megakadályozni. Az adatok legalább három, egymástól független kísérlet eredményein alapulnak.

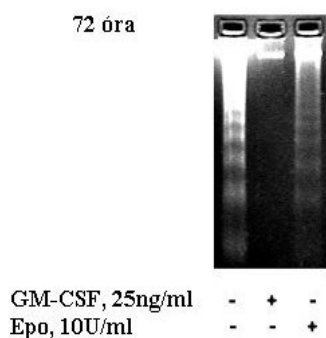
Összefoglalva megállapítható, hogy az Epo kezelés TF-1 sejtekben nem idéz elő sejtosztódást és nem védi meg a sejteket a GM-CSF megvonás okozta pusztulástól. Hasonló eredményt kapunk, amennyiben az élő sejtek arányát MTT viabilitási teszttel határoztuk meg.

A tapasztalt életképesség-csökkenés hátterében álló lehetséges mechanizmusok vizsgálata céljából az apoptózis jellegzetes markereit, a kaszpáz-3 enzim aktivitását és DNS-létra keletkezését vizsgáltuk (4.3. ábra A és B).

A



B



4.3 ábra A kaszpáz-3

enzimaktivitásának időfüggése (A) és a DNS létra (B) vizsgálata GM-CSF és Epo kezelést követően, illetve a kontroll sejtekben.

A 2,5 ng/ml GM-CSF mellett tartott (tenyészet) vagy a 16 óra GM-CSF megvonás után kezelt, illetve kezeletlen (kontroll) sejtekben mértük a kaszpáz-3 enzim aktivitását fluorimetriás módszerrel (részletes leírását lásd Módszerek fejezetben). Az ábrán három független kísérlet eredményét mutatjuk be, az értékeket 16 óra GM-CSF megvonás utáni sejtekben mért értékre vonatkoztattuk (A). 16 óra GM-CSF megvonás után a sejteket kezeltük a megadott anyagokkal, illetve kezeletlenül (kontroll) hagytuk. 72 óra után kinyertük a DNS-t a mintákból (B). A mintákat etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélen futattuk, majd az eredményt lefényképeztük

A kaszpáz-3 cisztein proteáz apoptotikus stimulusokra aktiválódó végrehajtó kaszpáz, amely -többek között- a DNS és a citoszkeleton integritásáért felelős fehérjék hasítását végzi. Az apoptotikus sejtek jellemző markere a fragmentálódott DNS, ami egy egyszerű gélelektroforézis során „DNS-létra” mintázatot eredményez a különböző méretű –és így eltérő mobilitású- frgmenteknek köszönhetően.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a 16 órás hormonmegvonás a tenyészetben mérhető értékhez képest a kaszpáz-3 enzim aktivitását közel kétszeresére emeli (3/A ábra). A GM-CSF visszaadása 2-3 órán belül a tenyészetben mérhető szintre csökkenti az enzim aktivitását, amely a vizsgált időtartamban már nem változik. Ezzel szemben mind az éhező kontroll, mind az Epo-val kezelt sejtek esetében a vizsgált időtartam alatt folyamatosan emelkedik a kaszpáz-3 enzim aktivitása. 48 órával a kezelések után az Epo-val kezelt, illetve az éhező kontroll sejtekben az apoptózisra jellemző DNS létra is kimutatható, szemben az ép DNS-t tartalmazó, GM-CSF-fel kezelt mintákkal (3/B ábra).

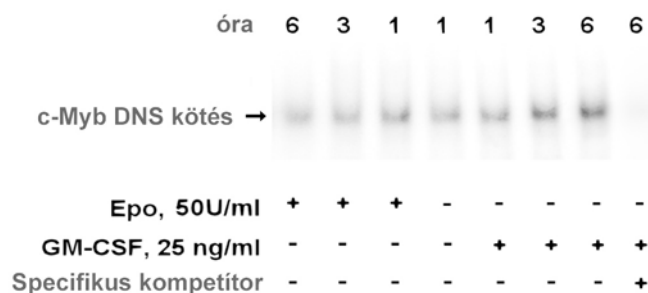
A továbbiakban megvizsgáltuk a Bcl-2 család két anti-apoptotikus tagjának, a Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjék mennyiségének változását Epo-indukált differenciáció, illetve GM-CSF indukált sejtosztódások során (az adatokat nem mutatjuk, lásd: Kolonics A et al. 2001 Cellular Signaling 3. ábra). Az említett anti-apoptotikus fehérjék mennyiségi változásainak kiértékelése során az előbbi méréseinket megerősítő eredményeket kaptunk, azaz Epo kezelés hatására az apoptotikus folyamatoknak kedvezően változik a Bcl-2 fehérje mennyisége, míg GM-CSF stimulus esetében a Bcl-2 és a Bcl-xL mennyisége szignifikánsan megemelkedik. Az említett fehérjék expressziós szintjének változása jól tükrözi a sejtciklus beindulását és az apoptotikus folyamatok leállítását ez utóbbi esetben.

4.1.3 GM-CSF illetve eritropoetin kezelés hatása a c-Myb transzkripciós faktor funkcionális aktivitására TF-1 sejtekben

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján, a c-Myb transzkripciós faktor mRNS szintjének csökkenése az eritroid differenciáció egyik korai markerének bizonyult különféle eritroleukémia sejtvonalak, valamint különböző hatásmechanizmusú differenciáltató ágensek esetében. Az említett transzkripciós faktor - több közlemény alapján (65, 70, 97, 157) negatívan szabályozza az eritroid irányú differenciációt és a proliferációnak kedvez.

Annak vizsgálata céljából, hogy valóban minden vizsgálati rendszerben általánosan érvényes-e a c-Myb transzkripciós faktor aktivitásnak csökkenése és az eritroid differenciáció kapcsolata, TF-1 sejtekben is megvizsgáltuk a c-Myb transzkripciós faktor aktivitását Epo-indukált eritroid differenciáció, illetve GM-CSF stimulus révén előidézett önfenntartó osztódások során.

A fehérje sejtben belüli aktivitását magi fehérje preparátumokból, elektroforetikus mobilitás-változás (EMSA) módszerrel határoztuk meg. E vizsgálati módszer segítségével a különböző kezeléseken átesett mintákban összehasonlítható a DNS-hez kötni képes, azaz funkcionálisan aktív c-Myb transzkripciós faktor mennyisége. A citokin stimulusok előtt a TF-1 sejteket jelen esetben is 16 órán keresztül GM-CSF-mentes, komplett médiumban inkubáltuk, majd eritropoetinnel illetve GM-CSF-fel kezeltük. A megadott időtartamok elteltével magi fehérje preparátumokat készítettünk, amelyekben a c-Myb DNS-kötődését vizsgáltuk. (4.4. ábra)



4.4. ábra A c-Myb transzkripciós faktor DNS-kötő képessége TF-1 sejtekben Epo-, illetve GM-CSF citokin stimulust követően.

16 órán át tartó hormonmegvonást követően TF-1 sejteket Epo-val és GM-CSF-fel kezeltük, majd a jelzett időtartamokat követően magi fehérje preparátumokat készítettünk. Ezekben a c-Myb transzkripciós faktor DNS kötő képességét, azaz funkcionális aktivitását vizsgáltuk EMSA segítségével. A kötődés specifikusságát nagy feleslegben adott hideg oligonukleotiddal történő leszorítás segítségével ellenőriztük.

EMSA analíziseink során azt az eredményt kaptuk, hogy a c-Myb DNS-kötődése a 6 órás vizsgálati időtartam alatt a GM-CSF kezelés hatására látványosan emelkedni kezd, míg az Epo kezelésnek nincs ilyen hatása.

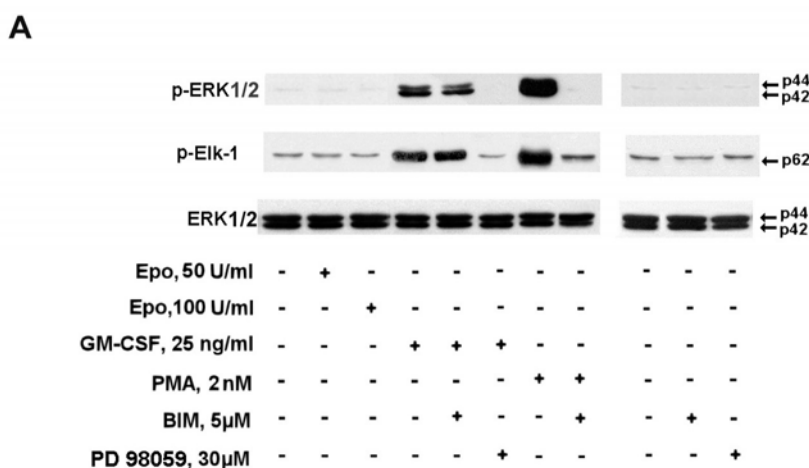
4.1.4 Mitogén Aktivált Protein Kináz Kaszkádok (MAPK) aktivitásának vizsgálata TF-1 sejtekben GM-CSF illetve Epo citokin stimulusok hatására

Az Epo- és a GM-CSF-receptor egyaránt az I-es típusú citokin receptorok családjába tartozik. E receptorokról leírták, hogy bizonyos vizsgálati rendszerekben az ERK-, a p38- és a SAPK/JNK MAPK útvonalakat egyaránt aktiválni képesek.

Az említett MAP kinázok Epo, illetve GM-CSF stimulusra való aktiválódásának lehetőségét -első megközelítésben- *in vitro* kináz aktivitás-mérés segítségével vizsgáltuk (az *in vitro* kináz assay során immunprecipitált kinázok aktivitását vizsgáljuk hozzáadott radioaktív szubsztrátok segítségével; az eredményeket lásd Kolonics A et al. Cellular Signalling közlemény 6. ábra). A JNK és a p38 stressz-válaszokhoz kapcsolható MAP kinázok esetében mérhető aktivitást tapasztaltunk már a GM-CSF-megvonást követően éhező kontroll mintákban is, amit azonban sem a GM-CSF, sem az Epo stimulus nem fokozott. A kezeletlen kontroll sejtekben nem volt kimutatható nagyságrendű Raf-1 aktivitás, a GM-CSF stimulus azonban látványosan aktiválta a Raf-1 kinázt. Az Epo kezelésnek ilyen hatása nem volt Kísérleteink alapján tehát egyedül a Raf-1/MEK-1 út aktiválódását figyeltük meg GM-CSF kezelés hatására. Az eritropoetin kezelés a

differentiáció indukcióhoz alkalmas kísérleti körülmények között sem a Raf-1, sem a p38, sem a JNK MAP kinázok aktiválódását nem idézte elő. Mivel a GM-CSF által aktivált Raf-1 a MEK (MAP ERK kináz) közvetítésével az ERK1/2 aktiválódásához vezet, a következőkben az ERK1/2 MAPK-ok aktivitását vizsgáltuk meg részletesebben.

A továbbiakban az ERK1/2 aktivitására a keresett fehérje aktív formáját specifikusan felismerő, foszfo-specifikus ellenanyagok segítségével, Western blot technika felhasználásával következtettünk (4.5. ábra). A 16 órás hormonmegvonás következtében a kezeletlen kontroll mintákban a Raf-1-hez hasonlóan az ERK1/2 kinázok aktivitása is a kimutatható tartomány alá süllyedt TF-1 sejtekben. Az ERK1/2 kinázok aktivációjára az általunk vizsgált rendszerben egyedül a GM-CSF citokin volt képes, az Epo még magas koncentrációban (50 U/ml és 100 U/ml) sem stimulálta az ERK1/2 foszforilációt (4.5/A ábra). A GM-CSF hatására bekövetkező ERK1/2 aktiváció az Elk-1, ERK-szubsztrát transzkripciós ko-faktor foszforilációját eredményezte.



4.5. ábra. Az ERK1/2 kinázok és a Elk-1 -ERK-szubsztrát- transzkripciós ko-faktor aktivitásában bekövetkező változások vizsgálata TF-1 sejtekben Epo- illetve GM-CSF stimulust követően, valamint a MEK és a PKC kinázok ERK aktivációban betöltött szerepének vizsgálata a MEK- és a klasszikus PKC izoformák farmakológiai gátlószereinek felhasználásával.

TF-1 sejteket 16 óra hormonmegvonást követően először a megadott farmakológiai gátlószerekkel, majd Epo illetve GM-CSF citokinekkal kezeltünk. A mintákból teljes sejtizátumokat készítettünk 15 perccel a citokin stimulusokat követően. A kapott fehérjemintákat Western blot technika felhasználásával foszfo-specifikus ellenanyagok segítségével analizáltuk BIM: klasszikus PKC izoformák gátlószere; PD 98059: MEK-1 inhibitor; PMA: PKC aktiválószer

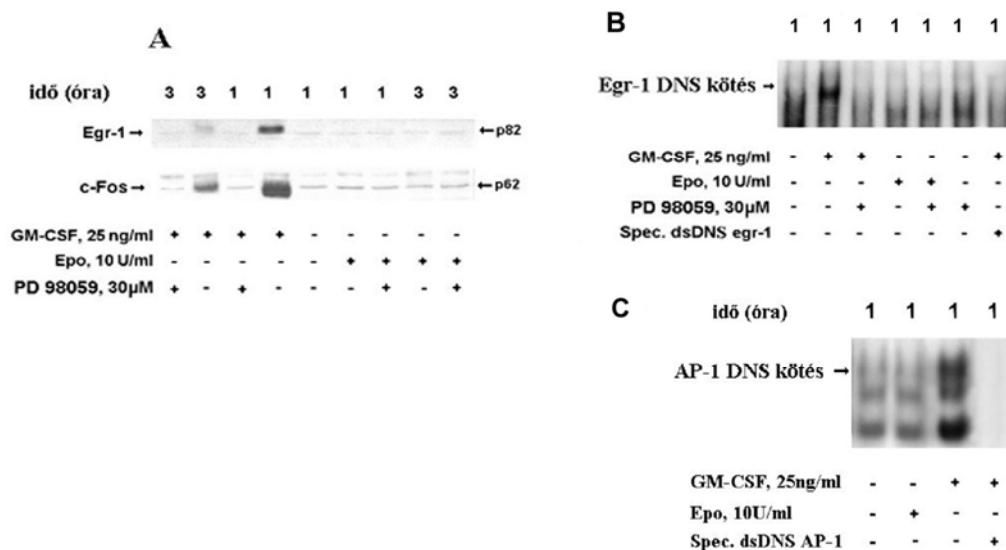
Farmakológiai MEK kináz inhibitorral végzett 30 perces előkezelés – 30 μ M PD98059 - a GM-CSF indukált ERK1/2 aktivációt teljes mértékben megakadályozta (5/A ábra). Mivel ismert, hogy a GM-CSF aktiválja a Ca^{2+} -független, DAG-függő PKC izoformát (158) is, megvizsgáltuk a PKC szerepét a GM-CSF indukált ERK1/2 aktivációban. Bár az irodalomból ismert, hogy az ERK1/2 aktiválódhat PKC közvetítésével is (159), jelen esetben a klasszikus PKC izoformák farmakológiai inhibitora, a BIM nem játszik szerepet a GM-CSF függő ERK1/2 aktivációban. A BIM inhibitor -a pozitív kontrollként alkalmazott forbol-észter (PMA) példáján látható módon- a PKC hatékony gátlószere.

Összefoglalva eredményeinket megállapíthatjuk, hogy annak ellenére hogy az irodalmi adatok alapján az Epo-R teljes hosszúságú formája többféle módon is aktiválhatja az ERK1/2 kinázokat (52, 160-162), TF-1 sejtek esetében az említett kináz kaszkád biztosan nem szükséges az eritroid differenciációt eredményező gének aktivációjához.

4.1.5 Az Epo és a GM-CSF hatása a c-Fos és az Egr-1 az azonnali korai válaszadó gének expressziójára, valamint az AP-1 és az Egr-1 transzkripciós faktorok DNS-kötő képességére

Az Egr-1 és a c-Fos gének olyan azonnali korai válaszadó gének, amelyek –többek között az Elk-1 és a CREB fehérjék közvetítésével- az ERK MAPK útvonal szabályozása alatt állnak (104, 163-166). Ezért megvizsgáltuk, hogy a mi modell rendszerünkben hogyan változik az Egr-1 és a c-Fos fehérjék mennyisége és DNS kötő képessége eritropoetin, illetve GM-CSF stimulus hatására. Emellett a PD98059 MEK-1 inhibitor alkalmazásával az ERK1/2-foszforiláció c-Fos, illetve Egr-1 expresszióban betöltött szerepének meghatározására törekedtünk.

Kísérleteink során a 4.6. ábrán feltüntetett időtartamokon keresztül 25 ng/ml GM-CSF-fel, illetve 10 U/ml Epo hormonnal kezeltük a GM-CSF-megvonással szinkronizált TF-1 sejteket, majd a teljes sejtlizátumokat specifikus ellenanyagok segítségével vizsgáltuk (6/A ábra). Emellett magi fehérje preparátumokat is készítettünk, amelyekből EMSA analíziseket végeztünk (4.6. ábra/B,C).



4.6. ábra. A *c-Fos* és az *Egr-1* transzkripciós faktorok mennyiségének és DNS-kötődésének aktiválódása TF-1 sejtekben Epo illetve GM-CSF stimulus hatására

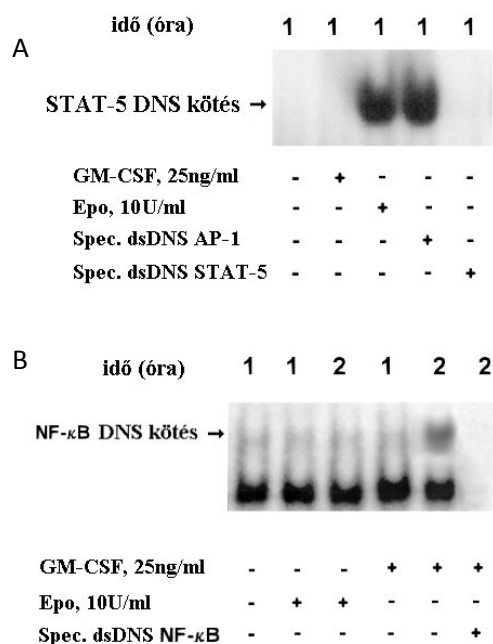
16 órán át tartó GM-CSF megvonást követően TF-1 sejteket 25ng/ml GM-CSF-fel illetve 10U/ml Epo-val kezeltük. A MEK kináz gátlószert (PD98059) a stimulusok előtt 30 perccel adtuk a mintákhoz. Az A ábra a vizsgált fehérjék mennyiségét mutatja teljes sejtlyázátumok Western blot vizsgálata alapján. A B és a C ábrán EMSA analízisek eredményei láthatók, amelyek az *Egr-1* és a *c-Fos* fehérjék funkcionális aktivitását, azaz DNS-kötő képességét mutatják.

GM-CSF kezelés hatására mind a *c-Fos*, mind az *Egr-1* azonnali korai válaszadó gén expressziója fokozódott és az említett két transzkripciós faktor fehérje-mennyisége jelentősen megemelkedett. A fehérjék szintje 1 óránál érte el a maximumot, majd fokozatosan csökkent. Epo hatására -a vizsgált időtartam alatt- sem a *c-Fos*, sem az *Egr-1* fehérje jelenlétét nem tudtuk kimutatni.

A MEK-1 gátlószert PD98059 minden időpontban tökéletesen gátolta a GM-CSF-indukált *c-Fos* és *Egr-1* szintézist (4.6./A ábra). A GM-CSF által előidézett *Egr-1* fehérjeszint-emelkedéssel összhangban állt az *Egr-1* DNS-kötődés változása is (4.6/C ábra). Az utóbbi eseményt ugyancsak tökéletesen gátolta a PD98059 MEK inhibitor (4.6 B/C ábra). A GM-CSF tehát az ERK1/2 aktivációján keresztül a *c-Fos* és az *Egr-1* azonnali válaszadó korai gének mennyiségének gyors növekedését okozta. Az Epo nem befolyásolta az említett transzkripciós faktorok expressziós szintjét, valamint funkcionális aktivitását sem a vizsgált időtartam alatt.

4.1.6. Az Epo és a GM-CSF hatása az NF- κ B és a STAT-5 transzkripciós faktorok funkcionális aktivitására

Mind az NF- κ B, mind a STAT-5 transzkripciós faktor fontos szerepet játszik a különféle hemopoetikus sejttípusok túlélésében és növekedésében (111, 167-169). Eredményeink azt mutatták, hogy az Epo ebben az esetben (vagyis TF-1 sejtekben) nem aktiválja a STAT-5 transzkripciós faktort, míg a GM-CSF igen (4.7/A ábra).



4.7. ábra. A STAT-5 és az NF- κ B transzkripciós faktorok DNS-kötő aktivitásának vizsgálata TF-1 sejtekben, Epo illetve GM-CSF stimulust követően.

16 órás hormonmegvonást követően TF-1 sejteket 25ng/ml GM-CSF-fel illetve 10U/ml Epo-val stimuláltunk, majd magi fehérje preparátumokat készítettünk. A vizsgált transzkripciós faktorok aktivitására DNS-kötő képességükből következtettünk, amelyet EMSA analízis segítségével határoztunk meg. A kötődési reakció specifikusságát nagy feleslegben alkalmazott hideg oligonukleotiddal történő leszorítás segítségével igazoltuk. A STAT-5 esetében ugyancsak nagy feleslegben adtunk egy másik (az AP-1 konszenzus szekvenciát tartalmazó) hideg oligonukleotidot is, amely a kötődési reakciót nem befolyásolta, azaz a DNS-kötés specifikus az alkalmazott oligonukleotid szekvenciára nézve.

Kísérleteink során – a differenciáció indukálására alkalmas körülmények között- EMSA analízis segítségével megvizsgáltuk TF-1 sejtekben, hogy az Epo aktiválja-e a STAT-5 transzkripciós faktor DNS-kötését. Hasonló eredményekre jutottunk az NF- κ B transzkripciós faktor aktivitásának vizsgálatakor is, azaz ebben az esetben is kizárólag a GM-CSF stimulus fokozta a fehérje DNS kötő képességét (4.7/B ábra). Ez összhangban áll

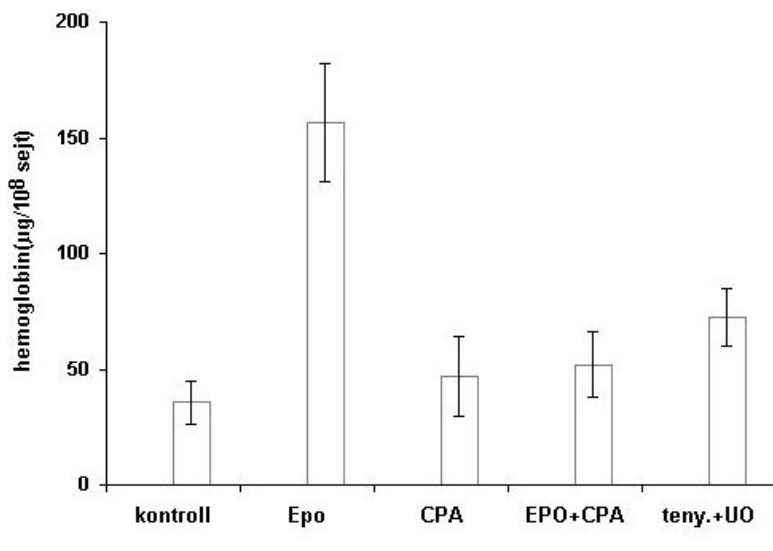
az irodalmi adatokkal, amelyek alapján az említett transzkripciós faktor eritroid sejtekben is kifejezetten a túléléshez és proliferációhoz szükséges gének expresszióját szabályozza.

Eredményeinket összefoglalva kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy TF-1 sejtekben az Epo nem tudja biztosítani sem a sejtek túlélését, sem proliferációjukat és a hormon jelenlétében a sejtek lassan apoptotizálnak. Ennek ellenére az Epo az eritroid irányú differenciációt elősegíti, hatására a sejtek hemoglobin szintje megemelkedik. A különféle -citokin-indukált sejtosztódáshoz és túléléshez kapcsolható- jelpályák részletes vizsgálata azt mutatta, hogy a Epo sem az ERK1/2, sem a p38, sem a JNK útvonal aktiválására nem képes. Nem aktiválódnak eritropoetin hatására az általunk vizsgált transzkripciós regulátorok; az Elk-1, a CREB, a c-Fos, az Egr-1, az AP-1, az NF- κ B és a STAT-5 sem. A GM-CSF viszont minden vizsgált növekedési és túlélési útvonalat aktivált, és kifejezetten az ERK1/2 MAP kinázok közvetítésével stimulálta az Elk-1, CREB, c-Fos, Egr-1 transzkripciós faktorokat is. A GM-CSF növekedési faktor az említett jelpályák aktiválásának köszönhetően az Epo hatására létrejövő eritroid differenciációt gátolta. A vizsgált jelátviteli útvonalak mindegyikéről elmondható, hogy TF-1 sejtek önmegújító osztódásáért felelnek és a differenciáció létrejöttét Epo jelenléte esetén is gátolják.

4.2 Az intracelluláris szabad $[Ca^{2+}]$ megemelkedése által aktivált jelpályák hatása TF-1 sejtek differenciációjára, túlélésére illetve proliferációjára

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján F4-6, valamint ELMI-1 egér eritroleukémia sejtek esetében a citoplazmatikus szabad kalcium koncentráció megemelésének hatására eritroid differenciáció következik be. Ebből kiindulva, a humán TF-1 sejt vonal esetében is megvizsgáltuk több, különböző hatásmechanizmussal működő $[Ca^{2+}]_i$ -emelő vegyület eritroid differenciációt befolyásoló hatását.

4.2.1 A citoplazmatikus szabad kalcium koncentráció megemelésének hatása TF-1 sejtek eritroid irányú differenciációjára, azaz hemoglobin tartalmára



4.8. ábra TF-1 sejtek hemoglobin tartalma 72 órával a különféle kezeléseket követően.

16 óra hormonmegvonást követően TF-1 sejteket az ábrán feltüntetett anyagokkal kezeltük, majd 72 órával a stimulusokat követően benzidin reakció alapján meghatároztuk a minták hemoglobin fehérjetartalmát. Az ábrán látható utolsó oszlop a tenyészetben növekvő sejtekhez adott MEK inhibitor hatását mutatja. CPA: ciklopiránsav, a szarko-endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz, azaz a SERCA pumpák gátlószere; teny: tenyészet; UO 126: MEK inhibitor

TF-1 sejteket 16 óra hormonmegvonást követően eritropoetinnel, SERCA pumpa inhibitorral (ciklopiránsav, CPA) illetve a kettő kombinációjával kezeltünk, majd 72 órával a kezeléseket követően benzidin-reakció alapján meghatároztuk a minták hemoglobin tartalmát. A SERCA (szarko-endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} -ATPáz) pumpa gátlószerek segítségével a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatása a receptorokon át aktiválódó jelpályáktól elkülönítve vizsgálható. A sejt nyugalmi állapotában az endoplazmatikus retikulum raktáraiból folyamatosan szivárog kis mennyiségű Ca^{2+} a citoplazmába, amelyet a SERCA fehérjék visszapumpálnak. Ebből következően a SERCA-pumpák gátlása a Ca^{2+} -raktárak fokozatos ürülését okozza, amelynek hatására a plazmamembránban található úgynevezett „store-operated” (kalcium raktár-függő) Ca^{2+} csatornák megnyílnak és további Ca^{2+} áramlik be a külső térből (170). A Ca^{2+} -ionofórok (az A23187 vagy az ionomycin) olyan Ca^{2+} -kelátorok, amelyek segítségével a Ca^{2+} a koncentráció gradiens irányában jut át a membránokon (171).

A 4.8. ábrán látható eredmények alapján a $[Ca^{2+}]_i$ megemelésével nem fokozható TF-1 sejtekben a hemoglobin szintézis (3. oszlop). A CPA abban az esetben, ha eritropoetinnel együtt adjuk a sejtekhez, a hormon hatását nemcsak nem fokozza, hanem jelentős mértékben gátolja ebben a sejttypusban (4. oszlop).

A továbbiakban az ERK1/2 kinázok eritroid differenciációban betöltött szerepének tisztázása céljából a GM-CSF növekedési faktor jelenlétében tenyésztett TF-1 sejteket UO126 MEK inhibitorral kezeltük, ugyanis a tenyészet esetében az ERK1/2 kinázok egyensúlyi aktivitása mérhető aktivitást mutat. A tenyészetben növe TF-1 sejtek esetében az ERK1/2 aktiváció farmakológiai gátlása önmagában mérhető nagyságrendű hemoglobin fehérjeszint emelkedést okoz, de a kapott hatás mértéke elmarad az eritropoetin kezelés esetén mérhető hemoglobin szinttől.

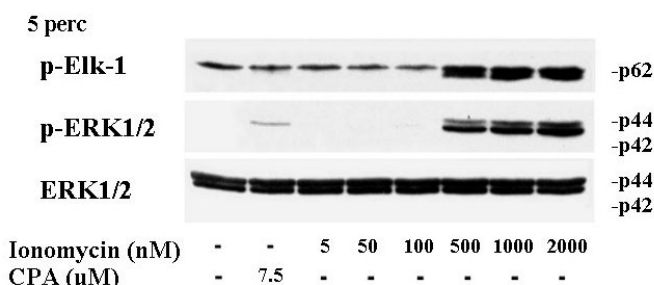
Összegezve az itt bemutatott kísérletünk eredményeképp megállapítható, hogy a differenciációt lehetővé tevő körülmények között (lásd Epo hatása) az intracelluláris szabad kalcium koncentráció megemelése TF-1 sejtekben nem idéz elő eritroid differenciációt, sőt gátolja az Epo indukált hemoglobin fehérjeszintézist. Ugyanakkor a tenyészetben a MEK kináz farmakológiai úton történő gátlása önmagában mérhető hemoglobin fehérjeszint emelkedést eredményez. Ebből arra következtethetünk, hogy TF-1 sejtekben az ERK1/2 kinázok aktivitása gátlóan hat a globin gének expressziójára, azaz az eritroid irányú differenciációra.

Mindezek alapján felmerül a kérdés, hogy az intracelluláris szabad kalcium koncentráció megemelése ebben a kísérleti rendszerben aktiválja-e az ERK1/2 MAPK kaszkádot.

4.2.2 Az ERK1/2 MAP kinázok kalcium-függő aktivációjának vizsgálata TF-1 sejtekben

A differenciáció indukciójához alkalmas kísérleti körülmények között, azaz a 16 órán keresztül GM-CSF-mentes médiumban tartott TF-1 sejtekben az ERK1/2 MAP kinázok egyensúlyi aktivitása lecsökken (ez a 4.9. ábrán szereplő kezeletlen kontroll). A hormonmegvonás miatt az apoptózis útjára állított sejtekben az intracelluláris $[Ca^{2+}]_i$ különböző módon –azaz ionomycin ionofórral vagy SERCA pumpa gátlással- előidézett megemelése az ERK1/2 fehérjék gyors aktiválódását eredményezi (4.9. ábra). A Western blot segítségével kapott adatok alapján az ERK1/2 aktiváció mértéke a $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés nagyságával arányos és az intracelluláris kalcium koncentráció bizonyos küszöbérték felé

való emelkedésekor következnek be. Az Elk-1 ERK1/2 szubsztrát transzkripciós aktivátor fehérje foszforilációja az ERK kinázok markáns aktivációja esetén tapasztalható a vizsgált időpontban.



4.9. ábra Az ERK1/2 kinázok és az Elk-1 (ERK szubsztrát) transzkripciós ko-aktivátor kalcium-függő aktiválódásának vizsgálata TF-1 sejtekben

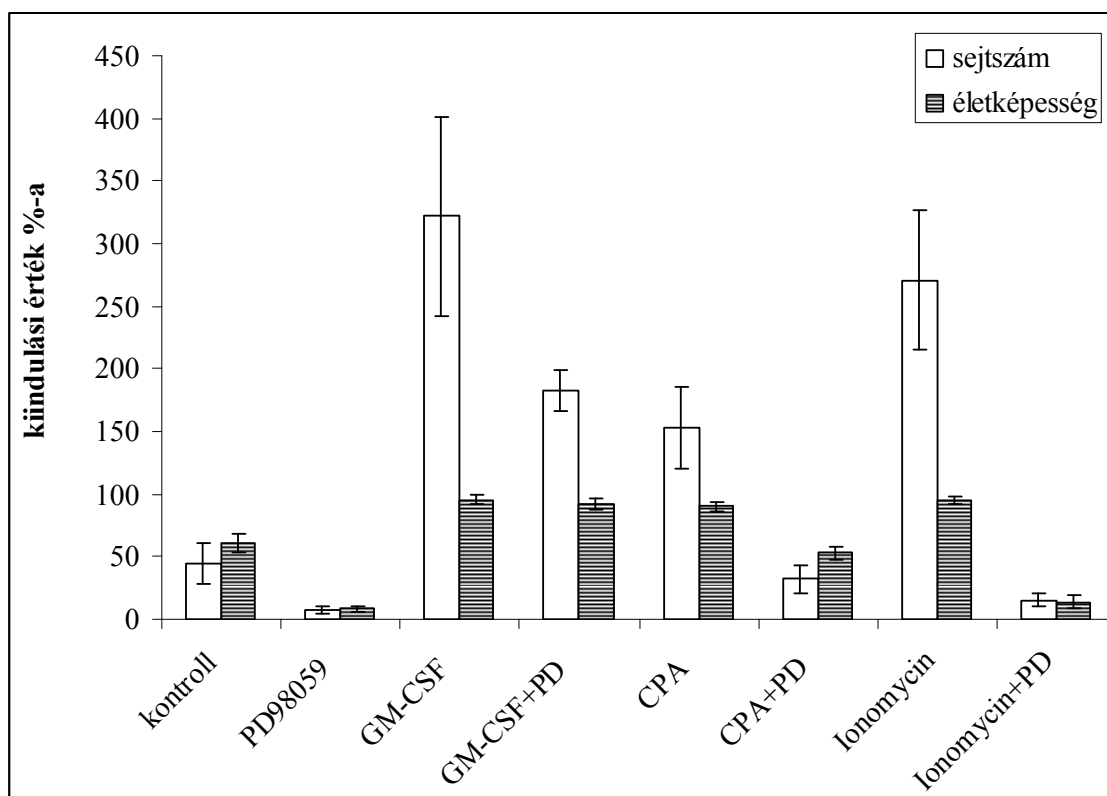
16 óra hormonmegvonást követően TF-1 sejteket SERCA pumpa gátlószerrel (CPA), valamint ionofórral (ionomycin) kezeltünk, majd 5 perc elteltével teljes sejtlizátumokat készítettünk a mintákból. A fehérje preparátumokat Western blot technika segítségével foszfo-specifikus illetve pan-specifikus ellenanyagokkal hívtunk elő.

4.2.3 A $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés által kiváltott sejtválaszok vizsgálata TF-1 sejtekben: a sejtszám és az életképesség változásai, valamint a MEK kináz szerepe az említett folyamatokban

A továbbiakban a különféle módon előidézett $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés hatására bekövetkező GM-CSF-független sejtválaszokat vizsgáltuk (4.10. ábra), valamint meghatároztuk az ERK kinázok szerepét is a tapasztalt sejtválaszokban. E célból a különféle stimulusok előtt PD 98059 MEK kináz inhibitorral kezeltük a sejteket.

A 4.10. ábrán bemutatott kísérletekben a TF-1 sejteket 16 órás hormonmegvonást követően GM-CSF-fel (2,5 ng/ml), ionomycinnel (1μM) és CPA-val (7,5μM) kezeltük, majd 48 óra múlva tripánkék kizárásos módszerrel meghatároztuk az élő sejtek számát, valamint a sejtek életképességét is. Az említett kezeléseket elvégeztük a MEK kináz farmakológiai gátlása mellett is (+ PD 98059). Az eredményeket minden esetben a kísérlet kezdetekor tapasztalt értékek (100%) arányában adtuk meg. (A 4.10. ábrán szereplő oszlopdiagram az Apati A, JBC 2003 közlemény II. táblázatában szereplő adatok ábrázolása.)

A vizsgált időtartam alatt GM-CSF mentes körülmények között a kezeletlen kontrollban az élő sejtek száma (fehér oszlopok), valamint a sejtek életképessége (szürke oszlopok) szignifikánsan lecsökkent. Evvel szemben a GM-CSF visszaadása sejtszám és az életképesség növekedését eredményezte. Az ionomycin a GM-CSF-hez hasonlóan megnövelte az élő sejtek számát, valamint a sejtek életképességét is, azaz TF-1 sejtekben hormonfüggetlen sejtosztódást eredményezett. CPA hatására a sejtszám a kiindulási értékhez képest nem változott jelentős mértékben, vagyis a sejtek hormonfüggetlen módon túléltek.



4.10. ábra. A citoplazmatikus kalcium koncentráció megemelésének hatása TF-1 sejtek hormonfüggetlen életképességére és az élő sejtek számának alakulására, valamint a különféle sejtválaszok MEK-1 inhibitorra (PD98059) mutatott érzékenysége.

A sejtek osztódását és életképességét tripánkék kizárásos módszerrel határoztuk meg, 48 órával a megadott kezeléseket követően. Az eredményeket a kiindulási sejtszámhoz (100%) viszonyítottuk. Az adatokat legalább három független kísérlet eredményeiből számoltuk (átlag±szórás(SD)).

TF-1 sejtekben tehát az $[Ca^{2+}]_i$ farmakológiai megemelésével hormonfüggetlen túlélést és sejtosztódást tapasztaltunk. A továbbiakban a PD 98059 MEK kináz gátlószer segítségével jellemeztük a MEK/ERK1/2-Elk-1 útvonal szerepét a $[Ca^{2+}]_i$ -indukált hormonfüggetlen túlélésében és osztódásában. A 16 órás hormonmegvonást követően TF-1 sejteket 30 μ M PD98059 MEK inhibitorral 30 percig előkezeltük, majd ezt követően

stimuláltuk a jelölt vegyületek hozzáadásával. A 4.10. ábra alapján a MEK-1 gátlása a sejtszám és az életképesség jelentős csökkenéséhez vezetett a kezeletlen kontroll, az ionomycin és a CPA kezelést követően. A GM-CSF-fel kezelt sejtekben a MEK-1 gátlása csak a sejtszámot gátolta számottevően, a sejtek életképessége nem változott.

Eredményeink azt mutatják, hogy a GM-CSF kezelést követő ERK1/2 aktiváció – egyéb sejten belüli faktorokkal együtt – a sejtosztódásban játszik szerepet, a TF-1 sejtek túlélését a GM-CSF receptorról induló más jelpályák biztosítják. Ezzel szemben a $[Ca^{2+}]_i$ - emelő szerekkel előidézhető hormon-független túléléshez, illetve osztódáshoz az ERK1/2 MAPK út aktiválódása nélkülözhetetlen.

4.2.4 Az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatása a c-Fos és az Egr-1 fehérjék expressziójára, valamint az AP-1 transzkripciós faktor aktivitására: az ERK1/2 kinázok szerepe

TF-1 sejteket 16 óra hormonmegvonást követően GM-CSF-fel (2,5 ng/ml), CPA-val (7,5 μ M), illetve ionomycinnel (1 μ M) kezeltünk, majd az ábrán jelölt időtartamok elteltével teljes sejtlizátumokat, valamint magi fehérje preparátumokat készítettünk. Ezekben az ERK1/2 kinázok aktivitását, az Elk-1 foszforilációt, a c-Fos és az Egr-1 fehérjék mennyiségét, valamint a Fos/Jun heterodimer AP-1 transzkripciós faktor DNS-kötését vizsgáltuk. Az Elk-1, ERK-szubsztrát transzkripciós kofaktor a szérum reszponz faktor (SRF) transzkripciós faktorhoz kötve részt vesz a szérum reszponz elem (SRE) konszenzus szekvenciát tartalmazó gének, így a c-Fos és az Egr-1 aktiválásában. Kísérleteink során megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy a c-Fos és az Egr-1 fehérjék expressziójában az ERK1/2 kinázok milyen szerepet töltenek be. Ehhez a TF-1 sejteket 16 órás hormonmegvonás után a PD98059 MEK inhibitorral 30 percig előkezeltük, majd ezt követően stimuláltuk a különféle vegyületekkel.

A 4.11/A ábrán a sejtosztódást eredményező ionomycin és GM-CSF kezeléseket vizsgáltuk. Az ionomycin esetében megfigyeltük, hogy az ERK1/2 kinázok foszforilációja már 5 perccel a kezelést követően jól detektálható, hasonlóan a GM-CSF növekedési hormonhoz. (Az ERK1/2 kinázok aktivitásának időbeli változását a stimulust követő 6 órán át követtük a GM-CSF növekedési faktorról összevetve; a kapott eredmények az Apati A. et al 2003 JBC közlemény 6. ábráján szerepelnek, a dolgozatban nem mutatjuk be.) A 4.11/A ábra alapján az ionomycin indukált ERK1/2- és Elk-1-aktiváció is teljes mértékben gátolható a PD98059 MEK inhibitorral, azaz más kináz nem játszik szerepet az ERK1/2 aktivációban. A stimulusokat követő 1 óránál megjelennek az

említett *Egr-1* és *c-Fos* azonnali korai válaszadó gének fehérjetermékei. Az *Egr-1* fehérje mennyisége a legnagyobb mértékben a GM-CSF stimulus hatására emelkedik meg, de jól kimutatható ionomycin kezelés esetén is, míg az éhező kontroll sejtekben expressziója nagyon alacsony szintű. A MEK/ERK/Elk-1 útvonal gátlásának hatására (PD98059) az *Egr-1* expressziója a kontroll szintjére csökken. A *c-Fos* fehérje esetében (4.11/A ábra) az ionomycin a GM-CSF-hez képest fokozott aktivációt eredményez, azonban ez is tökéletesen gátolható a PD98059 MEK inhibitorral.

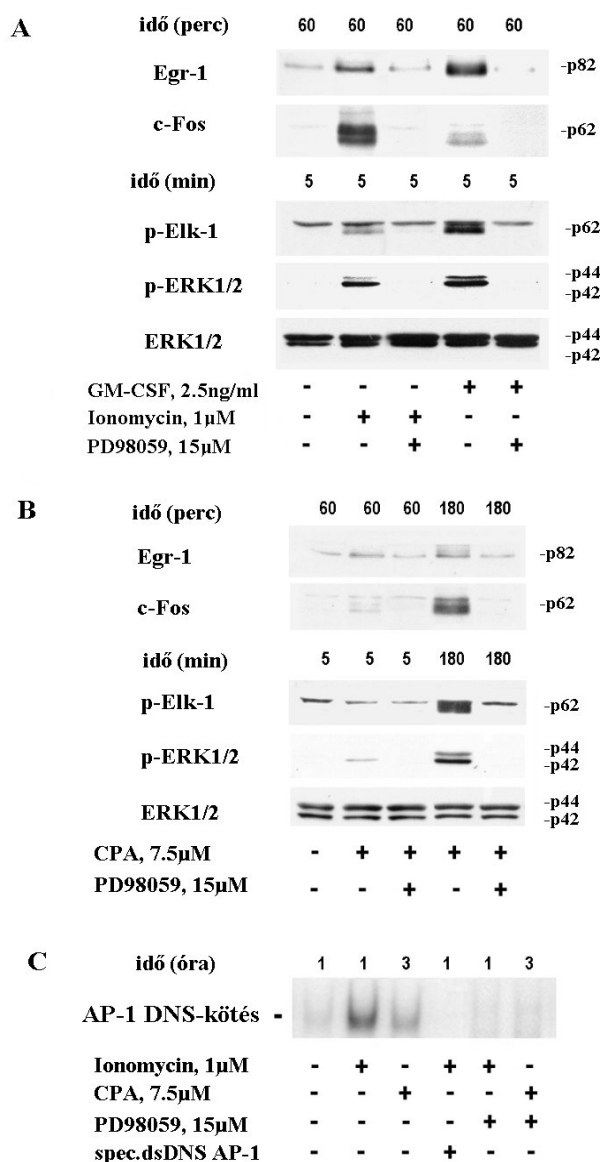
A 4.11/B ábrán a CPA-indukált hormon-független túlélés esetén megfigyelhető, hogy az ERK kinázok 5 perccel a stimulust követően nagyon gyengén, három óra múlva pedig erőteljesen aktiválódtak. Az Elk-1 foszforilációja ebben az esetben csak fokozott ERK1/2 aktivitás esetén, azaz 3 óránál jelent meg. Az ERK és Elk-1 aktivációval egyidőben jelent meg az *Egr-1* és a *c-Fos* fehérjék expressziója is, tehát a GM-CSF illetve az ionomycin hatásához képest időben késleltetve. Eredményeink alapján szembetűnő CPA-val kezelt TF-1 sejtekben a *c-Fos* fehérje fokozott jelenléte, míg az *Egr-1* expresszió (Western blot technika segítségével) éppen csak detektálható mértékű teljes sejtlizátumok vizsgálatakor. Hasonlóan a GM-CSF és az ionomycin kezelés esetén tapasztaltakkal, a CPA-indukált citoplazmatikus kalcium-szint emelkedés esetén a MEK kináz inhibitorral (PD98059) ez esetben is megakadályozható mind az *Egr-1*, mind a *c-Fos* fehérjék expressziója.

Összefoglalva elmondható, hogy a *c-Fos* és az *Egr-1* azonnali korai válaszadó gének expressziós szintjének legfőbb regulátora TF-1 sejtek esetében a MEK/ERK/Elk-1 MAPK útvonal.

A *c-Fos* fehérje egy Jun családba tartozó fehérjével dimerizálódva alakítja ki az AP-1 heterodimer transzkripciós faktort, amely különböző – sejtosztódáshoz, túléléshez és apoptózishoz egyaránt kapcsolható- gének átírását szabályozza.

16 óra hormonmegvonást követően TF-1 sejteket 7.5µM CPA-val, illetve 1 µM ionomycinnel kezeltünk, valamint az ERK szerepének a meghatározása céljából az említett stimulusok előtt 30 µM PD98059 MEK inhibitort is adtunk a mintákhoz. Ionomycin kezelés esetében 1 órával, CPA esetében 3 órával a stimulust követően magi fehérje preparátumokat készítettünk a mintákból, amelyekben az AP-1 transzkripciós faktor DNS-kötését vizsgáltuk. A jelzett időpontok megválasztása a maximális *c-Fos* expresszió alapján történt. EMSA vizsgálattal megállapítottuk, hogy a *c-Fos* fehérje mennyiségének növekedése esetén fokozódik az AP-1 transzkripciós faktor funkcionális aktivitása -vagyis DNS kötése- is, ami arra utal hogy a keletkezett *c-Fos* fehérjén megtörténnek azok a poszt-

transzkripciós módosulások, amelyek a transzkripcionális aktiválódáshoz szükségesek (4.11/C ábra). Eredményeink alapján az AP-1 transzkripciós faktor DNS-kötése ERK-függőnek bizonyult a különféle $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerrel kezelt sejtek esetében (4.11/C ábra), hasonlóan a c-Fos expresszióhoz.



4.11. A PD98059, MEK-1 gátlószert hatása az ERK1/2 és Elk-1 fehérjék foszforilációjára, a c-Fos és Egr-1 fehérjék mennyiségére GM-CSF és ionomycin (A) illetve CPA (B) kezelést követően. Az AP-1 DNS-kötésének vizsgálata MEK-1 gátlószert hatására ionomycin és CPA kezelést követően (C).

30 perc PD 98059 gátlószerttel való előkezelést követően a sejteket az ábrán feltüntetett szerekkel a megadott ideig kezeltük. A minták egy részéből fehérjét preparáltunk majd Western-blot módszerrel vizsgáltuk a p-ERK1/2 és p-Elk-1 fehérjék illetve a c-Fos és Egr-1 transzkripciós faktorok mennyiségét, a megfelelő ellenanyagok segítségével. A fehérje felvitelt anti-ERK1/2 ellenanyaggal való festés alapján ellenőriztük (A, B). A $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerekkel kezelt minták másik feléből kivontuk a magi fehérjéket és EMSA módszerrel vizsgáltuk az AP-1 transzkripciós faktor DNS-kötését. A DNS-kötés specifikusságát a legerősebb jel jelöletlen, AP-1 specifikus oligonukleotiddal való leszorítása alapján ellenőriztük (C).

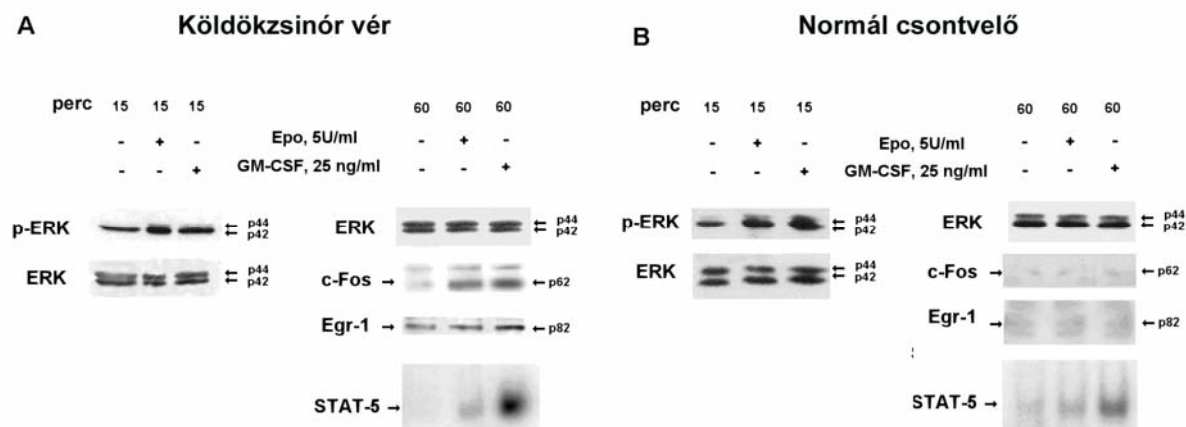
4.3. Citokin-receptor közvetített jelpályák normálistól eltérő aktivitásának vizsgálata mielodiszplázia esetén és az MDS akut limfoid leukémiává történő blasztos transzformációját követően

A következő kísérleteink során elsődleges célunk az Epo-receptor jelátvitel egyes kulcs, sejtosztódáshoz és túléléshez köthető komponenseinek vizsgálata volt MDS refrakter anémiával diagnosztizált betegek csontvelői mononukleáris sejt mintáiban. A refrakter anémia olyan al-típusa a mielodiszpláziás megbetegedéseknek, ahol kizárólag az eritroid fejlődési sor sérült, a többi sejttípus képződése normális. Egészséges sejtpopulációkkal való összehasonlítás révén az eritropoetin-indukált jelátviteli útvonalak normálistól való eltéréseinek megfigyelésére törekedtünk. A GM-CSF citokint pozitív kontrollként alkalmaztuk annak bizonyítására, hogy a vizsgált jelátviteli útvonalak aktiválhatóak (funkcionálisan működőképesek) az általunk vizsgált sejtpopulációkban. Mindezek mellett megvizsgáltuk azt is, hogy hogyan változik citokin stimulusok hatására a STAT-5 aktiváció, valamint a c-Fos és az Egr-1 –mitogén jelpályák hatására aktiválódó- azonnali korai válaszadó gének expressziója MDS RA betegekben.

További kísérletink során megvizsgáltuk a STAT-5 transzkripciós faktor aktivitását, a c-Fos és az Egr-1 fehérjék mennyiségét, valamint az AP-1 DNS kötését Epo, illetve GM-CSF citokin stimulációt követően olyan betegek mintáiban, akiknél az MDS akut leukémiává alakult át.

Munkánk során mononukleáris sejteket preparáltunk egészséges köldökszínór vérből, csontvelő biopszia klinikai analízise során egészségesnek nyilvánított csontvelői mintákból (normál csontvelő), MDS refrakter anémia al-típusába sorolható betegek csontvelői mintáiból, MDS-es betegek akut mieloid leukémiává történő blasztos transzformációját követően (MDS/AML) és *de novo* kialakult AML-es betegek csontvelői mintáiból. A szeparált sejteket a citokin-stimulusokat megelőzően 3 órán át szérum mentes RPMI médiumban inkubáltuk, majd 25 ng/ml GM-CSF-fel, illetve 5 U/ml hrEpo-val stimuláltuk a jelzett időintervallumok alatt. Ezt követően teljes sejtlizátumokat és magi fehérje izolátumokat készítettünk a mintákból.

4.3.1 Az ERK 1/2, STAT-5, c-Fos, Egr-1 és AP-1 mitogén szignálok Epo- illetve GM-CSF stimulusra adott válasza egészséges (normál) minták esetén



4.12. ábra : ERK foszforiláció, c-Fos és Egr-1 fehérjemennyiség változásai, valamint a STAT-5 transzkripciós faktor DNS-kötése egészséges köldökszinór vér (A), valamint egészséges csontvelő (B) eredetű mononukleáris sejtekben Epo illetve GM-CSF stimulus hatására.

Köldökszinór vérből, valamint egészséges csontvelői mintákból mononukleáris sejteket szeparáltunk, amelyeket ezt követően 3 órán át szérumentes RPMI médiumban inkubáltunk. Ezt követően a mintákat 5U/ml Epo-val, illetve 25 ng/ml GM-CSF-fel stimuláltuk, majd az ábrán szereplő időtartamok múlva teljes sejtlyázumokat és magi fehérje izolátumokat készítettünk. A teljes sejtlyázumokban Western blot technika segítségével meghatároztuk a foszfo-ERK1/2, ERK1/2, c-Fos és Egr-1 fehérjék mennyiségét. A magi fehérje preparátumokban a STAT-5 transzkripciós faktor DNS-kötő képességét vizsgáltuk. Az ábrán egy reprezentatív kísérletből kapott eredmények láthatók.

Egészséges mononukleáris sejtpopulációk Epo illetve GM-CSF stimulusra adott válasza a 4.12. ábrán látható. A köldökszinór vérből származó minták transzplantációs vizsgálatok alapján a normál csontvelőhöz hasonló sejtösszetétellel rendelkeznek és képesek a csontvelő repopulására (172). A jelen kísérletekhez használt citokinek -GM-CSF és Epo- által aktivált jelátviteli útvonalak közül a csontvelői progenitor sejtek túlélése és növekedése szempontjából kiemelt jelentősége van a JAK2/STAT-5 útvonalnak (173, 174). Az említett útvonal aktivitását EMSA segítségével, STAT-5 transzkripciós faktort kötő konszenzus szekvenciát (SIE) tartalmazó specifikus oligonuklotiddal, magi fehérje preparátumokból vizsgáltuk. Mindkét, általunk vizsgált citokin aktiválja a STAT-5 DNS-

kötő képességét normál csontvelő és köldökzsínór vér esetén egyaránt (a vizsgált 6 eset mindegyikében) (4.12. ábra A,B).

Az ERK1/2 MAPK kaszkád aktivációja részt vesz hemopoetikus sejtek osztódásának, túlélésének és differenciációjának szabályozásában egyaránt. (163, 164).

Kísérleteink eredményei alapján egészséges sejtpopulációk esetében (köldökzsínór vérből és felnőtt csontvelőből származó mintákban egyaránt) mind az Epo, mind a GM-CSF fokozza az ERK1/2 kinázok aktivitását.

A továbbiakban a c-Fos és az Egr-1 transzkripciós faktorok mennyiségét vizsgáltuk. Western blot technika segítségével normál csontvelői mintákban nem tudtuk kimutatni az említett két azonnali korai válaszadó gén fehérjeszintjének citokin-stimulus hatására bekövetkező emelkedését, míg detektálható szintű expressziót tapasztaltunk a köldökzsínór vérből származó mintákban, amelyet mindkét citokin stimulus tovább fokozott. Elképzelhető, hogy a tapasztalt jelenség hátterében a két sejtforrás eltérő mieloid progenitorsejt összetétele áll (175). Ezenkívül valószínű az is, hogy az említett két transzkripciós faktor indukálhatósága nagymértékben összefügg avval, hogy a sejtek mekkora hányada található a sejtciklus S fázisában (176).

4.3.2. Az ERK 1/2, STAT-5, c-Fos, Egr-1 és AP-1 mitogén szignálutak Epo- illetve GM-CSF stimulusra adott válasza MDS refrakter anémia (RA) esetén

Az általunk vizsgált 7 MDS RA csontvelői minta esetén kivétel nélkül minden esetben azt tapasztaltuk, hogy az Epo nem képes a STAT-5 DNS-kötését aktiválni, szemben a pozitív kontrollként alkalmazott GM-CSF-fel.

A további, részletesebb analízishez a 7 MDS RA esetből randomizáltan kiválasztottunk hármat, amelyekben az ERK foszforilációt, a c-Fos, Egr-1 fehérjeszinteket és az AP-1 transzkripciós faktor DNS kötő képességét vizsgáltunk. A kiválasztott betegminták mindegyikében az ERK kinázokat egyedül csak a GM-CSF citokin tudta stimulálni, az eritropoetin nem (4.13. ábra A). A c-Fos és Egr-1 fehérjék jelenléte az MDS-es minták esetében Western blot technika segítségével nem volt kimutatható és ezzel összhangban nem tapasztaltunk AP-1 DNS kötést sem, hasonlóan a normál csontvelői

mintákhoz. Ezen nem változatott sem a GM-CSF, sem az Epo stimulus.

1. Táblázat: klinikai háttér és a mononukleáris sejtfrakció citokin stimulusra adott válasza

Mononukle- áris sejtek forrása	Életkor /nem	FAB osztály	kezelés *	blast (%)**	60 perces kezelés					15 perces kezelés		
					c-Fos	AP-1	STAT-5	STAT-5	STAT-5	ERK1/2	ERK1/2	ERK1/2
					Kontroll	Kontroll	Kontroll	Epo	GM-CSF	Kontroll	Epo	GM-CSF
Köldök- zsinórvér	-	-	-	Nv	+	Nv	-	+	++	+	++	++
	-	-	-	Nv	+	Nv	-	+	++	+	++	++
	-	-	-	Nv	+	Nv	-	+	++	+	++	++
Egészséges	30/N	-	-	1	-	-	-	+	++	+	++	++
csontvelő	52/N	-	-	0	-	-	-	+	+	+	++	++
	68/N	-	-	1	-	-	-	+	++	+	++	++
MDS	78/N	RA	Nem	0	-	-	-	-	+	-	-	+
	32/N	RA	Nem	1	-	-	-	-	++	+	+	++
	68/N	RA	Nem	4	-	-	-	-	+	+	+	++
MDS/AML	24/N	M ₀	Igen	1	-	-	+	+	+			
	42/F	M ₄	Igen	0	-	-	+	+	+			
	50/F	M ₀	Nem	100	+	+	++	++	++			
AML	18/F	M ₂	Nem	95	+	+	+	+	+			
	50/N	M ₅	Nem	100	+	+	+	+	+			
	22/F	M ₂	Nem	98	+	+	++	++	++			

Rövidítések: Nv = nem vizsgáltuk, - = nem detektálható, + = detektálható, ++ = fokozott

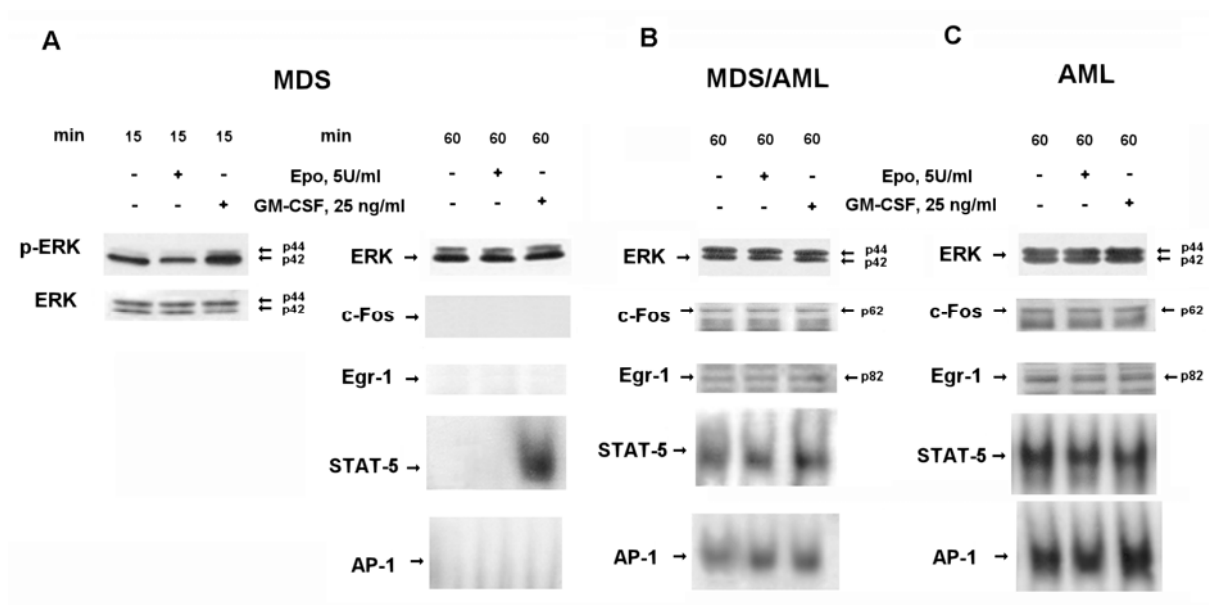
*Kezelés (a vizsgálatot megelőzően) Nem= a beteg nem kapott kemoterápiás kezelést, Igen= a beteg már korábban átesett a kemoterápiás kezelésen

**Blast %-ot a csontvelői kenet alapján a klinikusok állapították meg

4.1. Táblázat A klinikai háttér és a mononukleáris sejtek Epo, illetve GM-CSF citokin stimulusra adott válasza. Az általunk vizsgált, különböző eredetű mintákból preparált mononukleáris sejtek Epo, illetve GM-CSF stimulusra adott válasza: ERK1/2 foszforiláció (ahol jelölve), STAT-5 DNS kötés, c-Fos expresszió, AP-1 DNS kötés, három random módon kiválasztott eset vizsgálata alapján feltüntetve.

4.3.3. A STAT5 és AP-1 transzkripciós faktorok DNS-kötő képességének, valamint a c-Fos és Egr-1 fehérjék expressziós szintjeinek változásai MDS/AML blasztos transzformációt követően illetve de novo AML esetében

Az említett jelátviteli útvonalak vizsgálatához kiválasztott MDS/AML esetek eltérő kórtörténettel voltak jellemezhetők. Két esetben a kemoterápia befejezését követően, remissziót mutató csontvelő biopsziából végeztük a sejtszeparálást és az analízist, míg egy esetben a terápia előtt. Ez utóbbi minta esetében a csontvelőben kizárólag rosszindulatú blaszt sejtek voltak jelen. A 4.13/B ábrán látható eredmények a kemoterápiás kezelés előtt álló beteg csontvelői mintáit mutatják be.



4.13. ábra ERK foszforiláció MDS RA mononukleáris sejtekben Epo illetve GM-CSF stimulust követően

A c-Fos és Egr-1 fehérjék mennyiségének változásai, valamint a STAT-5 és az AP-1 transzkripciós faktorok DNS-kötése MDS refrakter anémia (A), MDS alapon kialakult akut mieloid leukémia (B) és *de novo* létrejött akut mieloid leukémia (C) eredetű mononukleáris sejtekben Epo illetve GM-CSF stimulus hatására.

MDS RA-val diagnosztizált betegek csontvelő biopsziás mintáiból, MDS/AML transzformációt követően, valamint *de novo* kialakult AML-es betegek csontvelői mintáiból mononukleáris sejteket szeparáltunk, majd ezután 3 órán át szérummentes RPMI médiumban inkubáltunk. Ezt követően a mintákat 5U/ml Epo-val, illetve 25 ng/ml GM-CSF-fel stimuláltuk és az ábrán szereplő időtartamok múlva teljes sejtlizátumokat, valamint magi fehérje izolátumokat készítettünk. A teljes sejtlizátumokban Western blot technika segítségével meghatároztuk a foszfo-ERK1/2, ERK1/2, c-Fos és Egr-1 fehérjék mennyiségét. A c-Fos és az Egr-1 fehérjék mennyiségi különbségeinek detektálásához az ábrán szereplő ERK fehérje az egyenlő fehérje felvitel kontrollja. A magi fehérje preparátumokban a STAT-5 transzkripciós faktor DNS-kötő képességét vizsgáltuk. Az ábrán egy-egy reprezentatív kísérletből kapott eredmények láthatók.

A 4.13/B ábra alapján megállapítható, hogy MDS/AML transzformációt követően jól detektálható mennyiségű c-Fos és Egr-1 proto-onkogén transzkripciós faktor található a csontvelői sejtekben, valamint citokin stimulus hiányában is erőteljes STAT-5 és AP-1 DNS-kötés tapasztalható. Citokin kezelés hatására egyik általunk vizsgált jelpálya aktivitása sem változik ebben az esetben. A másik két általunk vizsgált AML minta a sikeres kemoterápiát követően, kontroll vizsgálat során került levételre. Ebben az esetben a c-Fos és Egr-1 fehérjék jelenléte már nem volt detektálható és a csontvelői százalékos blaszt arány sem haladta meg az 1%-ot (4.1.táblázat). Ennek ellenére konstitutív, citokin stimulus független STAT-5 aktivációt tapasztaltunk, ami esetlegesen a klinikai

tünetmentesség ellenére magában hordozza a relapszus lehetőségét. Általánosan jellemző az MDS alapon kialakult akut leukémiákra, hogy a betegség visszatérésének valószínűsége nagy.

De novo (azaz újonnan és nem MDS-es betegekben kialakuló) AML esetekben – hasonlóan a kezelés előtt álló MDS/AML beteghez- citokin-független STAT-5 DNS-kötést és detektálható mennyiségű c-Fos és Egr-1 fehérjét tapasztaltunk. Elképzelhető, hogy a c-Fos és Egr-1 proto-onkogén transzkripciós faktorok expressziója és a fokozott AP-1 DNS-kötés összefüggésben lehet a csontvelői blaszt-szaporulat mértékével. A STAT-5 transzkripciós faktor konstitutívvá (citokin-függetlenné) válása egy olyan sejtklón felszaporodásából eredhet, amely citokin-független növekedése révén a többi csontvelői sejttel szemben előnyt élvez.

4.4 A Bcr-Abl fúziós fehérje által közvetített -proliferációhoz és túléléshez kapcsolható- jelpályák aktivitásában bekövetkező változások vizsgálata K562 sejtek eritroid differenciációja során

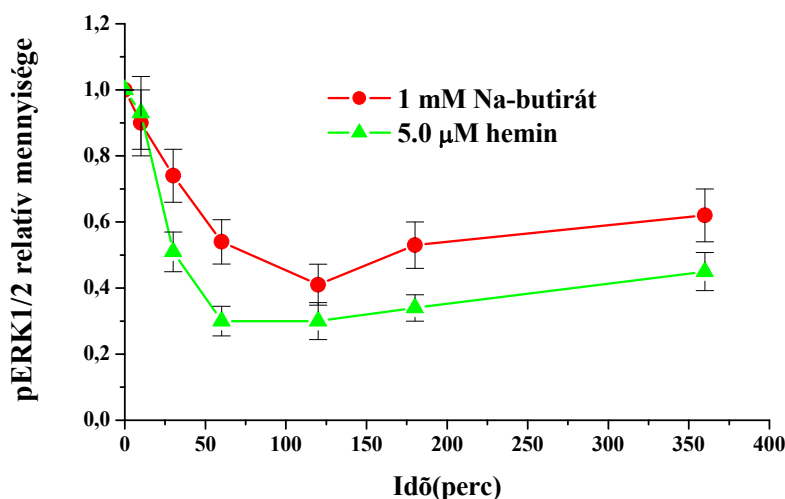
A K562 sejtvonal Philadelphia kromoszóma pozitív krónikus mieloid leukémia blasztos transzformációja során létrejött humán leukémia sejtvonal.

Munkánk során a betegség kialakulásával egyértelmű összefüggésben álló, konstitutív aktivitással jellemezhető Bcr-Abl fúziós tirozin kináz fehérje és az általa aktivált mitogén jelpályák eritroid differenciációban betöltött szerepét vizsgáltuk farmakológiai gátlószerek segítségével, valamint a fúziós fehérje mennyiségének shRNS technikával való csendesítése révén. Kiemelt célunk annak megállapítása volt, hogy az ERK1/2 és a STAT-5 mitogén szignálok egyensúlyi aktivitásában bekövetkező időbeli változások milyen összefüggésben állnak a differenciációval (azaz γ -globin expresszió fokozódással) illetve a sejtek önfenntartó osztódásával és apoptózisával.

4.4.1 A Bcr-Abl fehérje, valamint az ERK1/2 aktivitás farmakológiai gátlásának hatása K562 sejtek hemoglobin tartalmára, túlélésére és növekedésére

K562 sejteken végzett korábbi kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az eritroid differenciációt előidéző –szerkezetileg és hatásmechanizmusukat tekintve nem rokon– kémiai indukálószer az ERK1/2 kinázok egyensúlyi aktivitásának fokozatos csökkenését

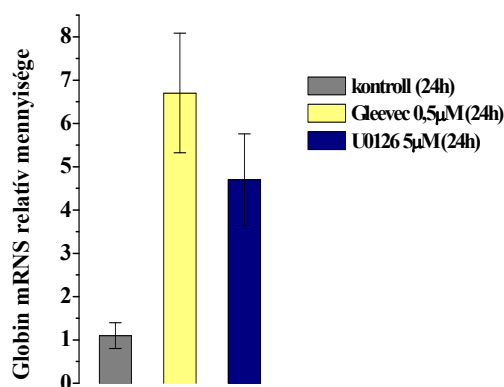
idézik elő. Amennyiben K562 sejteket heminnel és butiráttal kezeltük –amelyek K562 sejtek esetében jól ismert eritroid differenciációt indukáló szerek-, a mintákban a foszforilált ERK1/2 fehérjék mennyisége a kezeléseket követő 1 órán belül szignifikánsan csökkent a kiindulási értékhez viszonyítva mindkét vegyület esetében (16. ábra).



4.14. ábra Az ERK1/2 aktivitás időbeli változása K562 sejtekben, ismert kémiai indukálószerekkel előidézett eritroid differenciáció kezdeti szakaszában

K562 sejteket 5μM heminnel, illetve 1mM nátrium-butyráttal kezeltünk. Az ábrán szereplő időtartamok elteltével teljes sejtlizátumokat készítettünk a mintákból, majd azokban a foszforilált ERK1/2 fehérjék jelenlétét vizsgáltuk Western blot technika segítségével. Az egyforma fehérjefelvitel ellenőrzése céljából a PVDF membránokon az ERK 1/2 fehérjék összes mennyiségét is meghatároztuk, majd a szemi-quantitatív analízis során a kapott optikai denzitás értékeket az össz-ERK1/2 szintre normalizáltuk, amelyet tehát belső kontrollként alkalmaztunk. A kiindulási időpontban kapott értékekhez viszonyítottuk a többi időpontban preparált minta kiértékelése során kapott értékeket. Az ábrán legalább három független kísérlet eredményét tüntettük föl.

Ezt tapasztalva kíváncsiak voltunk arra, hogy a Bcr-Abl tirozin kináz farmakológiai gátlásával (STI 571/Gleevec/Imatinib mesylate) előidézhető-e K562 sejtekben az eritroid differenciáció, ugyanis a krónikus mieloid leukémia sejtekben az említett fúziós fehérje konstitutív tirozin kináz aktivitással rendelkezik és számos proliferációhoz kapcsolható jelátviteli útvonalat aktivál. Kísérleteink során választ kerestünk arra kérdésre is, hogy a MEK kináz farmakológiai inhibitorával (az UO126-tal) előidézett ERK kináz gátlás önmagában elegendő-e K562 sejtek eritroid irányú differenciációjának előidézéséhez.



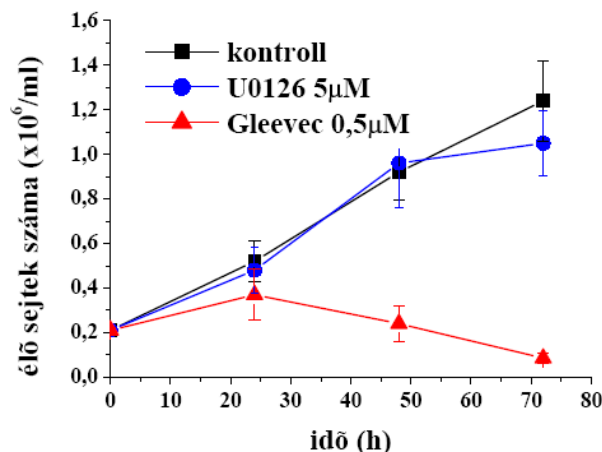
4.15. ábra Az eritroid differenciáció vizsgálata Gleevec-kel és UO126-tal kezelt sejtekben

Az ábrán kvantitatív real-time PCR segítségével mért relatív γ -globin mRNS mennyiségeket tüntettük fel. K562 sejtekből 24 órás Gleevec (0,5 μ M) illetve UO126 (5 μ M) kezelés után teljes RNS preparátumokat készítettünk, amelyekből reverz transzkripciót követően Light Cycler segítségével meghatároztuk a minták globin mRNS tartalmát. Belső kontrollként β_2 mikroglobulint használtunk, amelynek expressziós szintje esetünkben a különféle kezelések hatására a vizsgált időtartam alatt nem változott. A kapott adatokat a kezeletlen kontrollban mérhető globin mRNS mennyiségre normalizáltuk. Az ábrán három független kísérlet eredményeit és azok szórását tüntettük fel.

Az itt bemutatott kísérleteink során 5 μ M UO126 MEK inhibitort alkalmaztunk, mert ez a koncentráció hatékonyan gátolja az ERK1/2 foszforilációt. A Gleevecet 0,5 μ M koncentrációban alkalmaztuk, amely (177) alapján megfelel a vegyület K562 sejtekben mért IC_{50} értékének.

Eredményeink alapján mind az 5 μ M UO126, mind a 0,5 μ M Gleevec kezelés a hemoglobin szintézis jelentős fokozására képes K562 sejtekben. 5 μ M UO126 MEK inhibitorral való kezelés esetén ez a kontrollhoz képest 4-5-szörös fokozódást jelentett (4.15. ábra). Valamivel jelentősebb globin expresszió-növekedést váltott ki a 0,5 μ M Gleevec kezelés.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja az 5 μ M UO126, illetve a 0,5 μ M Gleevec kezelés K562 sejtek életképességét. E célból a sejteket az említett vegyületekkel kezeltük, majd tripánkék kizárásos módszerrel 72 órán át követtük az élő sejtek számának változását.

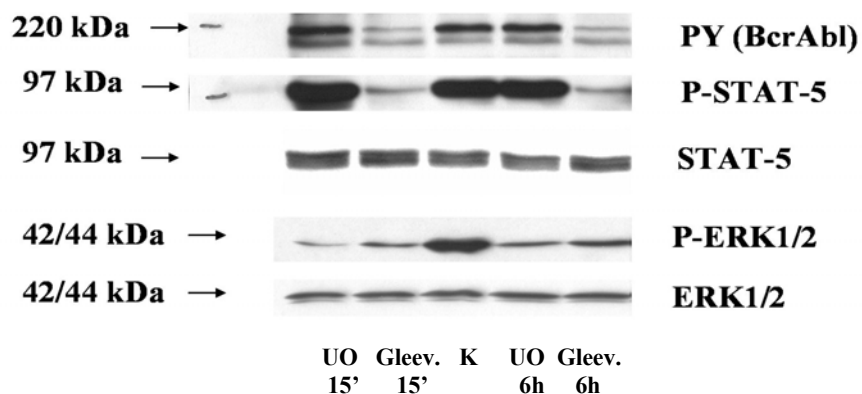


4.16. ábra Az élő sejtek számának változása 5μM UO126 illetve 0,5μM Gleevec kezelés hatására K562 sejtekben. Az élő sejtek számát tripánkék kizárásos módszerrel határoztuk meg. A kiindulási sejtszám az egyes mintákban $0,2 \times 10^6/\text{ml}$ volt. A sejtszám változásokat 72 órán át követtük. Az adatok legalább három független kísérlet eredményein alapulnak.

Eredményeink alapján az élő sejtek számának mérhető nagyságrendű csökkenését a vizsgált időtartamban egyedül a 0,5μM Gleevec kezelés eredményezi K562 sejtekben. Az UO126 MEK inhibitor -amely az ERK1/2 kinázok hatásos gátlószere és a hemoglobin szintézis jelentős fokozására képes K562- a sejtszám tekintetében még a kezelést követő 72 óránál sem eredményezett szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest (4.16. ábra).

A tapasztalt komplex sejtválaszok háttérében álló jelátviteli mechanizmusok tisztázása céljából megvizsgáltuk néhány, a sejtek növekedésében és túlélésében kiemelt jelentőségűnek tartott jelátviteli útvonal aktivitását 5μM UO126 és a 0,5μM Gleevec kezelést követően (4.17. ábra).

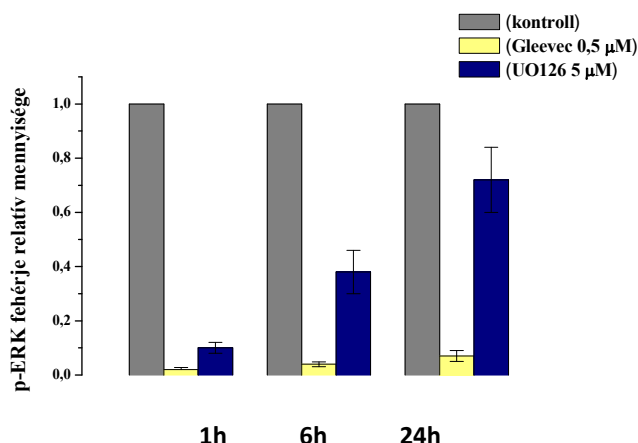
A 4.17. ábra alapján az állapítható meg, hogy a 0,5μM Gleevec kezelés 15 perccel a kezelést követően jelentős mértékben csökkenti a Bcr-Abl tirozin kináz foszforilációját, valamint ezzel egyidőben az ERK1/2 kinázok és a STAT-5 transzkripciós faktor aktivitását is. Az említett kezelés a Bcr-Abl, ERK1/2 és a STAT-5 aktivációt hosszú távon megakadályozza, ugyanis még hat órával a kezelése után is alacsony az említett fehérjék foszforilációs szintje. Ezzel szemben az UO126 –a vártak megfelelően- csak az ERK1/2 kinázok aktiválódását akadályozza meg, sem a Bcr-Abl tirozin foszforilációját, sem a STAT-5 aktivitását nem befolyásolja. Mindez arra utal, hogy az ERK1/2 aktivitás csökkenése önmagában elegendő K562 sejtekben az eritroid differenciáció indukciójához.



4.17. ábra A Bcr-Abl tirozin kináz, az ERK1/2 és a STAT-5 aktivitása K562 sejtekben 5 μ M UO126, illetve 0.5 μ M Gleevec kezelést követően

K562 sejteket 5 μ M UO126 (MEK), illetve 0.5 μ M Gleevec (Bcr-Abl) inhibitorokkal kezeltünk, majd az ábrán jelölt időtartamok elteltével, erős foszfatáz gátlás mellett teljes sejtlyizátumokat készítettünk a mintákból. A fehérje preparátumokban Western blot technika segítségével, foszfo-specifikus ellenanyagok felhasználásával megállapítottuk az aktív Bcr-Abl, STAT-5 és ERK1/2 fehérjék mennyiségét. A PVDF membránokat a másodlagos ellenanyag eltávolítása után előhívtuk az adott fehérje összes sejten belüli formáját felismerő ellenanyaggal is. Az ábrán a legalább három független kísérletből egy tipikus futtatás egyetlen PVDF membránja látható, több fajta ellenanyaggal előhívva.

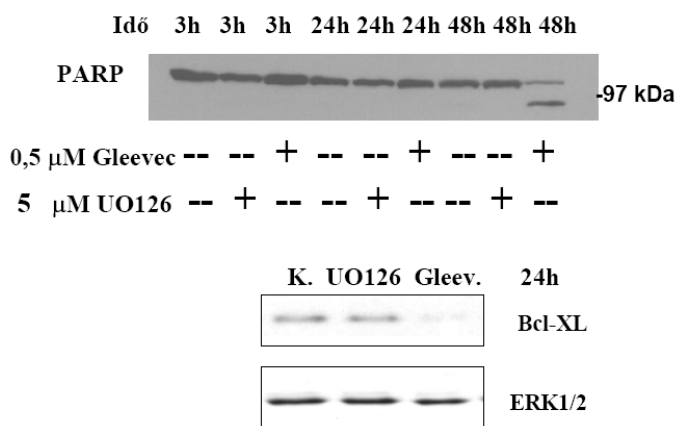
Az UO126 és a Gleevec hosszú távú hatásainak vizsgálata céljából az ERK1/2 aktivitását 24 órán át követtük. Eredményeink a 4.18. ábrán láthatóak.



4.18. ábra A p-ERK fehérje mennyiségének időbeli változása K562 sejtekben Gleevec és UO126 kezelés hatására. Az adatok három független kísérletből kapott Western blot eredményeinek kiértékelésén alapulnak. A foszforilált ERK1/2 jelek kiértékelése során kapott optikai denzitás értékeket a minták össz-ERK1/2 fehérje mennyiségére normalizáltuk és a kezeletlen a kontroll esetében kapott értékek arányában ábrázoltuk.

Az UO126 MEK1/2 inhibitor K562 sejtek esetében az ERK1/2 aktivitást legjobban 1 órával a kezelést követően gátolja. Ezt követően az ERK foszforiláció emelkedni kezd és a kezelést követő 24 óra elteltével közel a kezeletlen kontroll szintjére emelkedik, azaz az UO126 MEK inhibitor az ERK kinázok aktivitásának csak átmeneti csökkentésére képes. Ezzel szemben a 0–5μM Gleevec kezelés az ERK1/2 aktivitás tartós és erőteljes gátlását eredményezi

Az 5μM UO126 és a 0–5μM Gleevec kezelésekhez tartozó különböző életképesség (ld. korábban 18. ábra) adatok háttérében álló sejten belüli folyamatok háttérének tisztázása céljából a fent említett kezelések esetében megvizsgáltuk az apoptózis néhány jól ismert markerét is (4.19. ábra).



4.19. ábra **Az apoptózis vizsgálata Gleevec-kel és UO126-tal kezelt sejtekben**

K562 sejteket 5 μ M UO126-tal illetve 0–5 μ M Gleevec-kel kezeltünk, majd a jelölt időpontokként teljes sejtlizátumokat készítettünk. Western blot segítségével a PARP és a Bcl-xL fehérjék jelenlétét detektáltuk. A PARP enzim apoptotikus sejtekben az aktív kaszpáz-3-nak köszönhetően elhasad és a kapott fragmensek elektroforézissel detektálhatóak. A Bcl-xL a Bcl-2 családba tartozó anti-apoptotikus fehérje. Mennyiségét a konstans expressziójú ERK1/2 kinázokhoz hasonlítottuk.

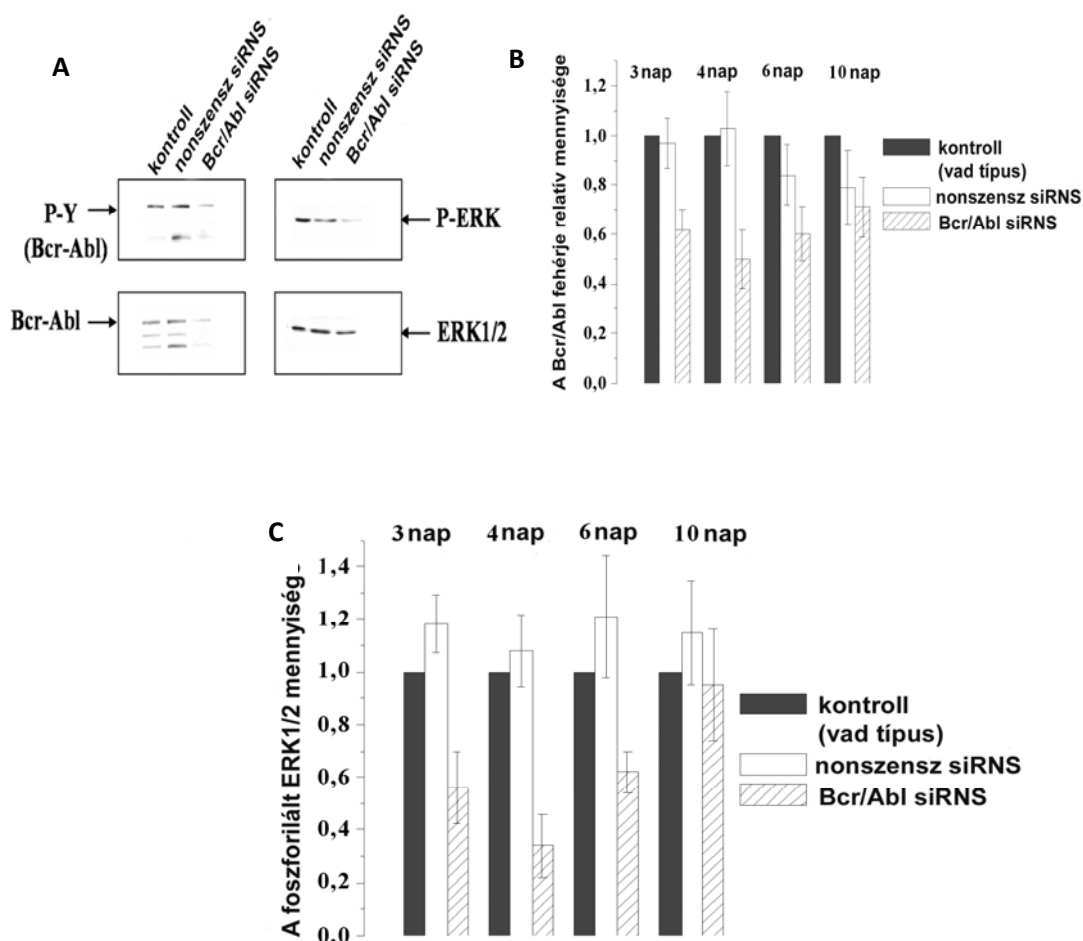
Az apoptózis során aktiválódó kaszpáz-3 proteáz hasítja a DNS hibajavításban részt vevő 116 kDa molekulatömegű PARP (poli-ADP-ribóz-polimeráz) enzimet. A 89 kDa molekulatömegű apoptotikus fragment Western blot technikával detektálható. A Bcl-xL a Bcl-2 családba tartozó anti-apoptotikus fehérje, mennyiségének csökkenése apoptózishoz vezet. Vizsgálataink alapján a kaszpáz-3 enzim egyedül a 0–5 μ M Gleevec kezelést követően, 48 óra múlva aktiválódik K562 sejtekben. Az UO126 MEK1/2 inhibitor nem okoz PARP hasítással jellemezhető kaszpáz-3 aktivációt, ami arra utal hogy apoptózis kizárólag a Gleevec kezelés hatására figyelhető meg K562 sejtekben. Ezt a megállapítást erősíti az is, hogy az anti-apoptikus Bcl-xL fehérje mennyisége egyedül 0–5 μ M Gleevec kezelés esetén csökken le.

4.4.2 *A stabilan beépülő Bcr-Abl ellen termeltetett shRNS-ek hatása K562 sejtek ERK aktivitására, differenciációjára és túlélésére*

A továbbiakban a Bcr-Abl fehérje mennyiségét stabilan beépülő retrovirális vektorból átíródó kis inhibitoros RNS-ek segítségével csökkentettük, majd az így előidézett sejtválaszokat, azaz a differenciációt és az apoptózist vizsgáltuk. A konstrukciókat úgy állítottuk össze, hogy a kis inhibitoros RNS templátján kívül EGFP riporter gént és puromycin szelekciós markert is tartalmazzon (részletesen lásd a Módszerek fejezetben). A fehérjét nem kódoló nonszensz shRNS-t expresszáló konstrukciót elsősorban a kis inhibitoros RNS-ek által aktivált interferon-szerű sejtválaszok, mint aspecifikus hatások kiküszöbölése miatt alkalmaztuk (178).

A K562 sejtek fertőzéséhez kettős virális pakolósejt rendszert használtunk (ld módszerek). A PG13 pakolósejt puromycin (4.5 μ g/ml) szelekciójának köszönhetően a Bcr-Abl és a nonszensz shRNS konstrukciók azonos nagyságrendű vírus titert eredményeztek. A K562 sejteket a vírusfertőzést követően 1.5 μ g/ml puromycinben szelektáltuk, majd a transzdukciót követő 3. naptól a 10. napig a jelölt időpontokban sejtlizátumokat készítettünk. A lizátumokban Western blot technika segítségével

határoztuk meg a Bcr-Abl fehérje mennyiségét, valamint a foszforilált, azaz aktív Bcr-Abl és ERK1/2 kinázok mennyiségét is ugyanazon PVDF membránok immunfestésével. A hatékony Bcr-Abl fehérjeszint csökkentés bizonyítéka a 4.20. ábrán látható.



4.20. ábra A különféle retrovirális konstrukciók hatása a Bcr-Abl fehérje mennyiségére, valamint az ERK 1/2 kinázok egyensúlyi aktivitására K562 sejtekben

A K562 sejteket a Bcr-Abl mRNA szintjét célzó, inhibitoros RNS-eket termelő retrovírussal fertőztünk, majd 2 napig 1,5 µg/ml puromycinben szelektáltunk. Hasonlóan jártunk el a kontrollként alkalmazott, duplaszálú kis hajtű struktúrát kialakító nonszensz RNS-t expresszáló konstrukcióval is. A két napos puromycin szelekciót követően a sejteket normál, komplett RPMI médiumban tartottuk és a transzdukciót követően a jelölt időtartamok elteltével teljes sejtlizátumokat készítettünk belőlük.

A sejtlizátumok Western blot analízise során vizsgáltuk a Bcr-Abl fehérje mennyiségét, a foszforilált Bcr-Abl, forma jelenlétét, valamint meghatároztuk az ERK1/2 kinázok aktivitását is. Végül minden egyes PVDF membránt előhívtunk anti-ERK1 ellenanyaggal is.

B A Bcr-Abl fehérje mennyiségét 10 napig követtük a különféle mintákban. A kiértékelések során a Bcr-Abl fehérjeszintekhez tartozó optikai denzitásokat a teljes ERK1/2 fehérje mennyiségével normalizáltuk, majd a kapott értékeket a mindenkorai sejtlizátum készítés kezletlen, vad típusú kontrolljához tartozó érték %-ában

adtuk meg. Az adatokat három független transzdukciós kísérlet, kísérletenként legalább két Western blot analízisének kiértékeléséből számoltuk

C A foszforilált ERK1/2 fehérje mennyiségét 10 napig követtük a különféle mintákban. A kiértékelések során a Bcr-Abl, illetve P-ERK1/2 fehérjeszintekhez tartozó optikai denzitásokat a teljes ERK1/2 fehérje mennyiségével normalizáltuk, majd a kapott értékeket a mindenkori sejtlizátum készítés kezeletlen, vad típusú kontrolljához tartozó érték %-ában adtuk meg. Az adatokat három független transzdukciós kísérlet, kísérletenként legalább két Western blot analízisének kiértékeléséből számoltuk.

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy a csendesítés illetve a retrovirális fertőzés nem változtatja meg az ERK1/2 kinázok expressziós szintjét K562 sejtekben (4.20. ábra A). Ebből kiindulva az összes további kiértékelésünk során az ERK1/2 fehérjék mennyiségét használtuk belső kontrollként (a minták fehérjetartalmának korrekciójához).

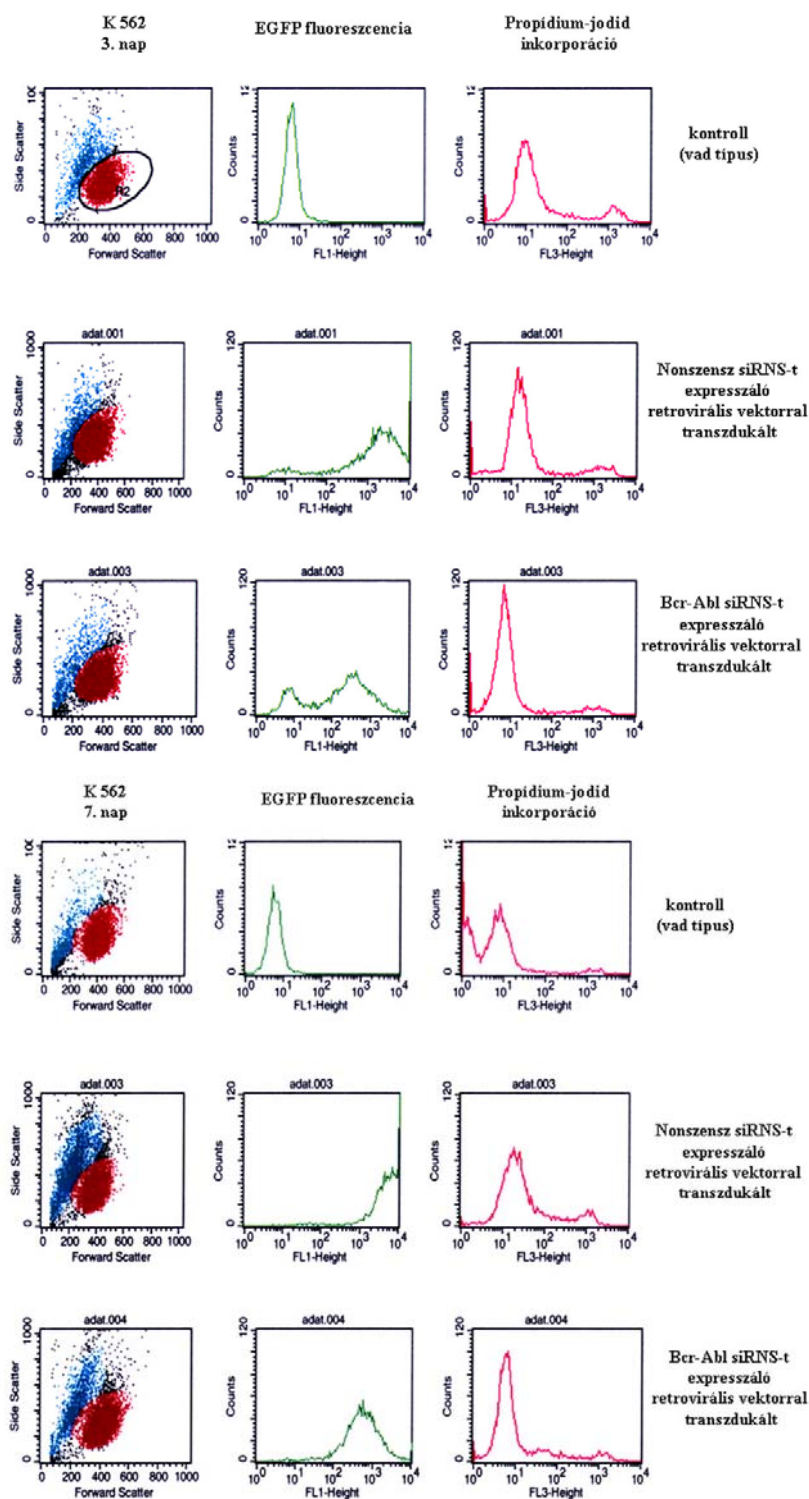
Eredményeink alapján az általunk létrehozott retrovirális konstrució a Bcr-Abl fehérje expressziós szintjét szignifikánsan csökkentette K562 sejtekben. A Bcr-Abl fehérje csökkent mennyisége csökkent funkcióval járt együtt, amelyet egyrészt a fehérje foszforilált formája, másrészt a mintákban detektálható foszforilált ERK1/2 szintje jelez (4.20. ábra A)

A Bcr-Abl fehérje szintjét 10 napig követtük a különféle transzdukált K562 sejtvonalakban, a vad típusú kontrollal összehasonlítva. A 22. B ábrán látható, hogy a Bcr-Abl mRNS szintet célzó shRNS mind a vad típushoz, mind a nonszensz konstrukcióhoz képest szignifikánsan csökkenteti a Bcr-Abl fehérje mennyiségét a transzdukciót követő harmadik napon. A negyedik napnál tapasztalható minimumot követően a fehérje szintje emelkedni kezdett és a transzdukciót követően a tizedik naptól a Bcr-Abl shRNS és a nonszensz konstrukció közötti különbség eltűnik.

A Bcr-Abl fehérjeszint megállapításához használt PVDF membránokat előhívtuk foszfo-ERK1/2 ellenanyaggal is. A kapott eredmények szemi-kvantitatív kiértékelése az 22 C. ábrán látható. Hasonlóan a Bcr-Abl fehérje mennyiségének változásához, az ERK1/2 kinázok aktivitása a Bcr-Abl ellen irányuló shRNS stabil expressziója esetén szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest és az ugyancsak negyedik napon észlelt minimumot követően fokozatosan emelkedni kezd. A transzdukciót követő 10. napra megszűnik az anti-Bcr-Abl konstrukció ERK aktivitást csökkentő hatása, amely tehát a sejten belüli csökkent Bcr-Abl kináz szintnek köszönhető.

A transzdukciót követő harmadik naptól kezdve kétnaponta áramlási citofluoriméterrel követtük az EGFP-t expresszáló sejtek arányát követtük a 21. napig. Ezzel egyidőben propídium-jodid inkorpráció segítségével a mintákban levő apoptotikus

sejtek arányát is detektáltuk. Az 1,5 μ g/ml puromicin szelekciónak köszönhetően mindkét konstrukció esetében nőtt az EGFP-t expresszáló sejtek száma (lásd EGFP fluoreszcencia változása a 3. naptól a 7. napig a 23.A és a 23.B ábrán). A 7. napra mindkét konstrukció esetében gyakorlatilag az összes sejt EGFP pozitívnak bizonyult (95% fölötti volt a transzdukció hatékonysága a szelekció következtében). Áramlási citofluorimetriás méréseink során megfigyeltük, hogy a nonszensz konstrukció esetében a sejtek átlagos fluoreszcencia értéke nagymértékben megnőtt a szelekció hatására, míg a Bcr-Abl shRNS konstrukció esetében hasonló jelenséget nem tapasztaltunk. Ennek ellenére megfigyeltük, hogy a puromycin kezelés hatására nő a Bcr-Abl shRNS konstrukciót expresszáló sejtek aránya.

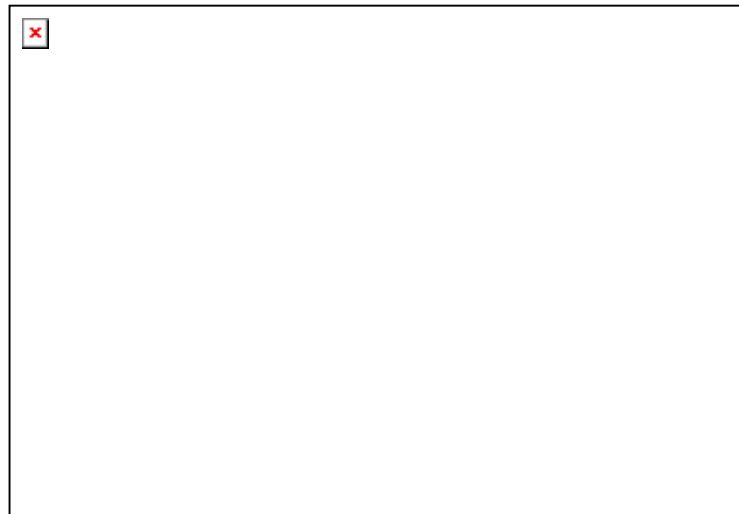


4.21. ábra A vizsgált konstrukciókat expresszáló sejtpopulációk fluoreszcenciájának áramlási citofluorimetriás vizsgálata az apoptózis egyidejű követésével propidium-jodid festődés alapján

A transzdukciót követő 3. (A) és 7. (B) napon áramlási citofluoriméterrel megvizsgáltuk az EGFP riporter fehérjét expresszáló, azaz a vizsgált konstrukciókat hordozó sejtek arányát. A mintákhoz az EGFP detektálását követően propidium jodidot adtunk, ez majd megvizsgáltuk, hogy feltételezhető-e a sejtek pusztulása a mintákban.

A minták egyidejű propídium-jodidos festése alapján azt állapítottuk meg, hogy a Bcr-Abl shRNS konstrukciót expresszáló mintákban nem nő meg számottevően a pusztuló sejtek aránya. Ezzel párhuzamosan tripánkék kizárásos sejtszám analízisünk sem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll mintákhoz képest a Bcr-Abl siRNS-t expresszáló mintákban. Ugyanakkor megfigyeltük, hogy a nonszensz konstrukciót igen nagy fluoreszcencia intenzitással expresszáló mintákban némiképp fokozódik a propídium-jodid festődés és a tripánkék kizárás alapján is nő az elpusztult sejtek száma. Elképzeléseink alapján ez az EGFP fehérje toxikus hatásának köszönhető K562 sejtekben.

Végül megvizsgáltuk, hogy a Bcr-Abl fúziós fehérje mennyiségének csökkentése siRNS stabil expressziója esetén eredményez-e fokozott globin expressziót. Ehhez az interferon-szerű válaszok és az egyéb komplex sejten belüli aspecifikus hatások kiküszöbölése céljából a két retrovirális konstrukciót expresszáló sejtpopulációt hasonlítottuk össze (4.22. ábra). Eredményeink alapján az előzőekben bemutatott mértékű Bcr-Abl fehérjeszint csökkenés szignifikáns globin expresszió növekedést eredményez K562 sejtekben.



4.22. ábra **Az eritroid differenciáció vizsgálata K562 sejtekben csökkent Bcr-Abl fehérjeszint esetén**

A sejtek differenciációját a globin mRNS szintek összehasonlításával ellenőriztük, RT-PCR segítségével. Referencia génként a β_2 mikroglobulint használtuk fel. A Bcr-Abl si RNS konstrukció hatást a nonszensz si RNS-t expresszáló mintákra normalizálva ábrázoltuk.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy K562 sejtekben a Bcr-Abl fehérje retrovirális vektorból átíródó siRNS-ek révén való csökkentése a Bcr-Abl fehérjeszint átmeneti

csökkenését eredményezi K562 sejtekben, amely annak ellenére, hogy nem idéz elő szignifikáns sejtpusztulást, a sejtek fokozott globin expressziójához vezet. Ez megerősíti azt az elképzelésünket, hogy K562 sejtekben az apoptózis és a differenciáció egymástól tökéletesen szétválasztható folyamatok.

5. MEGBESZÉLÉS

A vérképző sejtek differenciációja során a sztochasztikus és/vagy hierarchikus módon aktiválódó jelátviteli kaszkádok szekvencia-specifius transzkripciós faktorok aktiválódásán keresztül határozzák meg az adott sejt típusra jellemző génexpressziós mintázatot. A differenciáció, sejtosztódás és apoptózis molekuláris eseményei egymással szoros összeköttetésben állva, a különböző jelátviteli kaszkádokban található átfedések (azaz azonos mediátorok) révén szabályozzák a sejt választ. Közismert, hogy a hemopoetikus előalakok önmegújulásának, differenciációjának és apoptózisának defektusai közismerten alapvető szerepet töltenek be a leukémiák kialakulása során, ám az önmegújító osztódások és a differenciáció -illetve az arra való elköteleződés- közti döntéshozatal ma még jórészt ismeretlen szabályozás alatt áll. Az említett folyamatok molekuláris szintű hátterének jobb megértése alapvetően fontos az újabb -leukémiás sejteket célzottan és hatékonyan elpusztító- terápiás stratégiák kifejlesztése szempontjából.

A dolgozatban bemutatott munka során használt TF-1 humán mieloid leukémia sejt vonal teljes mértékben citokin-függő, azaz a szérumban kívül túléléséhez és osztódásához GM-CSF vagy IL-3 citokint igényel (129). Az említett sejt vonal kromoszomális átrendeződés következtében nagy mennyiségben expresszál egy C-terminálisan 96 aminosavval megrövidült, fontos tirozin foszforilációs hely (Y343) közvetlen környezetében mutációt is hordozó Epo receptort (37, 179, 180). Ez az Epo-receptor az említett pontmutáció következtében a STAT-5 transzkripciós faktor aktiválására nem képes. Mindezek alapján elmondható, hogy a TF-1 Epo-R működési mechanizmusát tekintve megegyezik a CFU-E alakkokra jellemző csonka Epo receptorral (EpoR/T), ami a JAK2 aktiválásán kívül egyéb jelátviteli eseményt nem eredményez. A citokin-függő TF-1 sejt vonal tehát egy egyedülálló humán modellrendszer, amely alkalmas a GM-CSF receptor közvetített túléléshez és sejtosztódásokhoz kapcsolható jelátviteli események és az Epo indukált, eritroid differenciációt eredményező intracelluláris folyamatok egymástól való elkülönítésére.

TF-1 sejt vonalon végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az eritropoetin kizárólag abban az esetben fokozza a sejtek a hemoglobin szintézisét, ha a növekedési

faktort előzetesen eltávolítjuk. Ennek megfelelően, a maximális mértékű hemoglobin fehérjeszint emelkedést 16 órás hormonmegvonást követő Epo-stimulus esetén tapasztaltuk. TF-1 sejtekben az Epo-indukált hemoglobin-képződést tökéletesen gátolta a differenciáció-indukciót követő GM-CSF stimulus. Mindezek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a GM-CSF által aktivált jelpályák megakadályozzák az eritropoetin indukált differenciációt.

TF-1 sejtek vizsgálata során több kutatócsoport is azt tapasztalta, hogy az Epo képes eritroid differenciációt indukálni (37, 181), míg egyes közleményekben ennek az ellenkezőjéről számoltak be (130, 182, 183). E jelenség hátterében feltehetőleg az eltérő kísérleti körülmények alkalmazása áll, mint például a növekedési hormon jelenlétében alkalmazott Epo stimulus. Nem valószínű, hogy az általunk használt TF-1 sejtvonal különbözne az eredetileg leírt és izolált sejtípustól, ugyanis 2,5 ng/ml GM-CSF-ben való tenyésztés esetén, áramlási citofluorimetriás méréseink alapján 95% CD34+/CD38-, 98% CD33+, míg a CD14, a CD15 granulocita és monocita prekursorokra jellemző markereket nem expresszálja és nincs rajta az érettebb eritroid alakokra jellemző glikoforin A sem.

A STAT-5 transzkripció faktor eritroid differenciáció során betöltött szerepe az irodalmi adatok alapján ellentmondásos. TF-1 sejteken végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a differenciációra alkalmas körülmények között –a GM-CSF megvonás hatására- a STAT-5 transzkripció faktor DNS-kötő aktivitása a kimutathatóság határa alá csökken. A GM-CSF visszaadása aktiválja a STAT-5 DNS-kötést és sejtosztódáshoz vezet. Ezzel szemben a hemoglobin szintézist indukáló eritropoetin kezelés nem aktiválja a STAT-5-öt, nem idéz elő sejtosztódást, valamint nem védi meg a sejteket az apoptózistól sem.

A mutáns sejtek Epo receptoráról többen is megállapították, hogy nem képes a STAT-5 aktiválására (37, 179, 180). Az irodalmi adatok alapján ellentmondásos a teljes hosszúságú Epo-receptor által aktivált STAT-5 eritroid differenciációban betöltött szerepe. Domináns negatív STAT-5 fehérje overexpressziója ELMI-1 egér eritroleukémia sejtekben gátolja az eritropoetin indukált eritroid differenciációt –azaz hemoglobin szintézist-, ami azt sugallja, hogy a STAT-5 fontos szerepet játszik a differenciáció során (35). A TF-1 sejtvonal mutáns Epo receptora ugyanakkor FDCP-1 egér sejtekben expresszáltatva -annak ellenére, hogy nem aktiválja a STAT-5 útvonalat - elősegíti az eritroid differenciációt. TF-1 sejtekben a teljes hosszúságú Epo receptor overexpressziója elnyomja az endogén rövid receptor indukált differenciációt és emellett túlélést, sejtosztódást, valamint STAT-5 aktivációt eredményez. Mindez arra utal, hogy a STAT-5 aktiváció hiánya az általunk is

vizsgált sejttípusban nemcsak hogy kedvez a differenciációnak (37), hanem jelenléte teljes mértékben gátolja azt. Említésre méltó, hogy az előbb említett kísérleti rendszerben -a teljes hosszúságú Epo-R exogén expressziója esetén- a STAT-5 aktiváció mellett az Epo-R összes C-terminális tirozinjáról induló jelpályája is aktív. Mivel a GM-CSF-R és az Epo-R ugyanabba a citokin receptor családba tartozik, az említett vizsgálati rendszer lényegében véve megegyezik az általunk alkalmazott GM-CSF + Epo kombinált kezeléssel. Ez tovább erősíti megállapításunkat, mely szerint a növekedéshez és túléléshez kapcsolható jelpályák működése kifejezetten gátolja a rövid Epo-R hemoglobin szintézishez vezető jelátviteli eseményeit. Mindezek mellett elképzelhető, hogy az Epo jelenlétében megfigyelhető sejtpusztulás hátterében a STAT-5 aktiváció hiánya áll, ugyanis az említett transzkripciós faktor számos túléléshez és sejtosztódáshoz kapcsolható gént aktivál (11).

TF-1 sejteken végzett további kísérleteink során megállapítottuk, hogy a GM-CSF az önfenntartó osztódások során -a STAT-5 transzkripciós faktor DNS-kötő képességének fokozása mellett- aktiválja a Raf/MEK/ERK/Elk-1 MAP kináz útvonalat, a *c-Fos* és az *Egr-1* azonnali korai válaszdó gének átírását, valamint az Egr-1, az AP-1, az NF- κ B és a c-Myb transzkripciós faktorok DNS-kötő képességét is. Az eritropoetin ezzel ellenétben a fent említett, túléléshez és proliferációhoz kapcsolható jelpályák egyikét sem aktiválja, valamint a GM-CSF növekedési faktor az említett útvonalak aktiválásán keresztül gátolja az Epo jelenlétében végbemenő eritroid differenciációt.

A TF-1 sejtek csonka Epo-receptora tehát annak ellenére, hogy nem aktiválja a növekedési faktor megvonása következtében inaktiválódó Raf/MEK/ERK/Elk-1 útvonalat, képes a hemoglobin szintézis fokozására. A differenciáció-indukcióhoz alkalmas kísérleti körülmények között a foszforilált ERK1/2 mennyisége a kimutathatóság határa alatt van, amelyet az Epo semmilyen körülmények között nem aktivál. Az eritropoetin emellett nem aktivál egyéb, úgynevezett stressz-aktivált MAPK útvonalakat sem (p38, JNK). Mindez azt támasztja alá, hogy az Epo receptor az összes általunk vizsgált MAPK útvonalat az Y343 tirozinjától C-terminális felé eső molekuláris részek közvetítésével aktiválja más rendszerekben, mivel a TF-1 sejt csonka Epo receptora ezen molekuláris részeket nem tartalmazza. Ez tovább erősíti azt a megállapítást, hogy a TF-1 sejt Epo-receptora –annak ellenére, hogy kromoszomális transzlokáció eredményeképp jött létre– működési mechanizmusát tekintve megegyezik a fiziológiás körülmények között létező csonka/rövid Epo receptorral. Ez utóbbi receptor-forma nem közvetít növekedési és túlélési jeleket, hanem kizárólag a differenciációt segíti elő olyan eritroid progenitorok esetében, melyek túlélését és osztódását egyéb citokinek biztosítják (14). Tehát annak ellenére, hogy az Epo-

R teljes hosszúságú formája az irodalmi adatok alapján aktiválja az ERK1/2 kinázokat (52, 160-162), nem valószínű hogy ez a jelenség aktív szerepet játszik az Epo-indukált eritroid differenciáció során. Kísérleteink eredménye alapján megállapítható, hogy TF-1 sejtek esetében esetében biztosan nem szükséges az ERK-aktiváció az Epo-indukált eritroid differenciációhoz, valamint a differenciációra jellemző fenotípus megjelenése ellenére TF-1 sejtek Epo jelenlétében apoptózissal elpusztulnak (aktiválódik a kaszpáz-3 enzim, megjelenik a DNS-létra és csökken az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék mennyisége).

Eredményeink alapján az Epo nem aktiválja sem a c-Fos, sem az Egr-1 azonnali korai válaszadó gének expresszióját, így ezek a transzkripciós faktorok nem vesznek részt TF-1 sejtekben az eritroid irányú differenciációhoz szükséges gének kifejeződésében. Ezzel szemben a GM-CSF-fel indukált önfenntartó osztódások során mind a c-Fos/AP-1, mind az Egr-1 aktiválódása ERK-függő folyamat (65, 70, 97, 103, 157)-

A c-Myb transzkripciós faktor - több tudományos közlemény alapján gátolja az eritroid irányú differenciációt és a sejtosztódásnak kedvez. Evvel összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy a c-Myb DNS-kötés mértéke a sejtosztódással áll összefüggésben. A GM-CSF kezelés amellett, hogy gátolja az Epo-indukált hemoglobinképződést, fokozza a c-Myb transzkripciós faktor aktivitását. Mindez arra utal, hogy a c-Myb fehérje jelenléte egyértelműen gátolja a differenciációt.

A *c-myb* gén promóter régiójában van κ B enhancer szakasz, amelyhez az NF- κ B család fehérjéi kötnek (120). Birkenkamp és munkatársai kimutatták, hogy az ERK1/2 aktivációját követően megemelkedik az NF- κ B transzkripciós faktor DNS-kötő képessége TF-1 sejtekben (184), és ennek következtében megszűnik a hormonmegvonás-indukált apoptózis. A mi vizsgálati rendszerünkben GM-CSF stimulus hatására fokozott NF- κ B DNS-kötődést tapasztaltunk, míg az Epo kezelésnek nem volt ilyen hatása. Az, hogy a GM-CSF által indukált ERK1/2 aktiváció közvetlen összefüggésben áll-e az NF- κ B -és ezen keresztül a c-Myb- aktivitás növekedésével, további vizsgálatokat igényel. Az NF- κ B transzkripciós faktorról ugyanakkor ismert az is, hogy nemcsak transzkripciós aktivátorként, hanem represszorként is funkcionálhat. Az NF- κ B transzkripciós faktor – többek között- gátolja az α -szerű globin gének expresszióját, valamint az NF-E2 transzkripciós faktor p45 eritroid specifikus alegységének kifejeződését is (122). Ez a mi esetünkben megmagyarázhatja, hogy a GM-CSF jelenléte hogyan akadályozza meg az Epo-indukált eritroid differenciációt TF-1 sejtekben. A növekedési faktor hiányában megfigyelhető apoptózis során a csökkent NF- κ B funkció fontos szerepet tölthet be,

ugyanis az NF- κ B megfelelő működése –melyet számos citokin aktivál- elengedhetetlen humán CD34⁺ progenitorok túléléséhez (185).

Annak ellenére, hogy TF-1 sejtek esetében nem ismert az eritroid irányú differenciációt előidéző kémiai indukálószer, az ERK1/2 kinázok farmakológiai gátlószerével (UO126) való kezelés mérhető nagyságrendű hemoglobin fehérjeszint emelkedést eredményezett a tenyészetben növekvő sejtek esetében. Mindez azt igazolja, hogy a növekedési faktor jelenlétében az Epo-ra mutatott válaszképtelenség hátterében –részben- a GM-CSF által aktivált ERK1/2 kinázok állnak, illetve hogy e sejtípus esetében az ERK1/2 kinázok aktivitása gátolja a sejtek eritroid irányú differenciációját és kifejezetten az önmegújító osztódásoknak kedvez. Ezen megállapításunk összhangban van más modellsejteken végzett vizsgálatok eredményeivel is. Eritopoetin-függő egér eritroleukémia sejtekben (186) az ERK1/2 kinázok aktivációja egyedül az Epo-indukált sejtosztódáshoz szükséges, a differenciációt nem befolyásolja. SKT6 egér eritroleukémia sejtek Epo-indukált differenciációjához Nagata közleménye szerint (187) az ERK kinázok aktiválódása nem szükséges, a p38 és a JNK MAP kinázoké viszont igen. Az ERK1/2 aktivitásának gátlása önmagában fokozza Friend vírus indukált egér eritroleukémia sejtek hemoglobin szintézisét (61).

További kísérleteink során megfigyeltük, hogy TF-1 sejtekben a differenciációra alkalmas kísérleti körülmények között az intracelluláris szabad kalcium koncentráció megemelése nem fokozza a sejtek hemoglobin szintézisét, szemben más -kutatócsoportunk által korábban vizsgált- eritroleukémia sejtvonalakokkal (F4-6 és ELMI-1). Ez alapján megállapítható, hogy az intracelluláris szabad kalcium koncentráció megemelkedése révén kiváltott eritroid differenciáció nem általános jelenség. A $[Ca^{2+}]_i$ valószínűleg fejlődési stádiumtól/érettségi foktól függően befolyásolja az eritroid specifikus gének expresszióját. Ezt alátámasztja az is, hogy az Epo receptor-aktivált intracelluláris kalcium jel megjelenése vizsgálati rendszer-függő (70).

Áramlási citofluorimetriás méréseink alapján a citoplazmatikus kalcium szint emelkedés TF-1 sejtekben nem idézett elő sem monocita, sem granulocita irányú differenciációt, mint ahogy nem kedvezett az eritroid differenciációnak sem (ezen adatok nem szerepelnek a dolgozatban).

A $[Ca^{2+}]_i$ megemelése amellet, hogy nem idéz elő eritroid differenciációt TF-1 sejtekben, aktiválja az ERK1/2 MAP kinázokat a növekedési faktor hiányában is. Mindez tovább

erősíti, hogy TF-1 sejtekben az ERK1/2 aktiváció nem kedvez a differenciációnak. A dolgozatban bemutatásra került kísérleteink alapján a CPA (SERCA pumpa gátlószer) ugyanúgy gátolja TF-1 sejtek Epo indukált hemoglobin szintézisét, mint a GM-CSF.

Az előbbi eredményeinket összegezve megállapítható, hogy TF-1 sejtekben az általunk vizsgált -sejtosztódásban, illetve a sejtek túlélésében alapvető szerepet játszó-jelátviteli útvonalak közül egy sem aktiválódik az eritropoetin kezeléssel kiváltott differenciáció során, sőt az említett jelályák aktivitása gátolja az eritroid differenciáció létrejöttét.

Mivel a leukémiák kialakulása az irodalom mai álláspontja alapján kétirányú folyamat eredménye, -korlátlan proliferáció és gátolt differenciáció- felvetődik a kérdés, hogy az ERK1/2 kinázok milyen szerepet játszanak TF-1 sejtek túlélése és önmegújító sejtosztódásai során.

TF-1 sejten végzett vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ megemelése amellet, hogy nem idéz elő eritroid differenciációt, aktiválja az ERK MAPK útvonalat és növekedési faktor-független túlélést illetve osztódást eredményez. További kísérleteink eredményeképp megállapítottuk, hogy a növekedési faktor (GM-CSF) indukált ERK1/2 aktiváció –egyéb sejten belüli faktorokkal együtt- az önmegújító sejtosztódásban játszik szerepet, míg TF-1 sejtek túlélését a GM-CSF receptorról induló más jelpályák biztosítják. Ezzel szemben a $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerekkel előidézhető GM-CSF-független túléléshez, illetve osztódáshoz az ERK1/2 MAPK út aktiválódása nélkülözhetetlen. TF-1 sejten végzett kísérleteink alapján megállapítható az is, hogy az Elk-1 transzkripciók ko-faktor ebben a rendszerben ERK1/2-függően aktiválódik és ez az Ets családba tartozó transzkripciók aktivátor valószínűleg a túléléshez kapcsolható gének átíródását serkenti.

Összefoglalva megállapítható, hogy az ERK aktiváció tartós elmaradása a TF-1 sejtek fokozatos apoptózisához vezet. Az ERK kinázok aktivációja által előidézett sejtválasz túlélés (CPA), vagy sejtosztódás (GM-CSF, ionomycin). Az ERK szerepe meghatározó jelentőségű a kalcium-indukált folyamatok esetében. Az önmegújító sejtosztódások során bizonyos alternatív jelátviteli folyamatok is alapvető szerepet tölthetnek be. Mindezzel összhangban az irodalmi adatok alapján konstitutív Raf-1 overexpressziója megszünteti TF-1 sejtek növekedési faktor függőségét (188). Eredményeinket alátámasztja az a megfigyelés is, hogy a Raf-1 kináz szerepe bizonyos sejttypusok esetében elsősorban az apoptózis gátlása, nem pedig a sejtosztódás elősegítése.

A Raf-1 az apoptózist a kaszpázok aktivációjának gátlásán keresztül akadályozza meg (189).

TF-1 sejten folytatott további vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a c-Fos és az Egr-1 fehérjék szintézise citoplazmatikus Ca^{2+} szint megemelésével előidézhető, ERK1/2-függő folyamat. A *c-Fos* és az *Egr-1* fehérjék gének átíródása túlnyomórészt az Elk-1 transzkripció ko-faktor aktiválódásának köszönhető. Hasonló kinetikával, de eltérő arányban emeli a GM-CSF növekedési faktor mindkét transzkripció faktor mennyiségét. Míg az Egr-1 expresszió -akárcsak az ERK1/2 aktiváció és a sejtszám növekedés-meghaladja, addig a c-Fos mennyisége nem éri el a CPA vagy az ionomycin kezelés esetén tapasztaltakat. Ez azzal magyarázható, hogy a c-Fos génben található egy Ca^{2+} -függő intragenikus szabályozó elem (190). Mivel a GM-CSF nem emeli meg a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, valószínű, hogy az említett mechanizmus ez utóbbi esetben nem aktiválódik és így az átírás is kisebb határfokú. Az Egr-1 az irodalmi adatok alapján a sejtosztódás és a monocita irányú differenciáció egyik fontos tényezője, hatása sejttípustól függő (191). A mi kísérleti körülményeink között, a legmagasabb Egr-1 fehérje szintet a GM-CSF-fel kezelt sejtekben láttuk, ahol a sejtszám növekedés is a legnagyobb volt. Ionomycin hatására mérsékelt Egr-1- és sejtszám növekedést tapasztaltunk. CPA hatására csak igen gyenge expressziós változást figyeltünk meg. Eredményeink azt mutatják, hogy ebben a – feltehetően- viszonylag éretlen progenitor sejtől származó leukémia sejtvonalban az Egr-1 mennyisége a sejtszám növekedésével van összhangban, azaz a sejtosztódás pozitív regulátora. A *c-fos* és az *egr-1* azonnali válaszadó korai gének átírását teljes mértékben gátolja a MEK-1 gátlószertel (PD98059) való előkezelés TF-1 sejtek esetében.

A terminális differenciáció során az elköteleződött progenitorsejtekben egy olyan genetikai program aktiválódik, amely meghatározza a hátralevő sejtosztódások számát és a specializált fenotípus létrejöttének pontos idejét. Az önmegújító osztódások és a terminális differenciáció megfelelő egyensúlya alapvető szerepet tölt be a hemopoetikus rendszer homeosztázisának megőrzése szempontjából, a prekursorok és érett sejtek megfelelő számának fenntartása révén. A mielodiszpláziák során ez a kényes egyensúly felborul (192). A mielodiszpláziás szindrómára egy adott progenitorsejt típusba tartozó alakok normálistól eltérő proliferációja és differenciációja jellemző. Az MDS RA kizárólag az eritroid fejlődési sort érintő betegség. Annak ellenére, hogy a csontvelőben az esetek

többségében fokozott eritroid jelenlét tapasztalható, a periférián megjelenő vörösvértestek sokszor abnormális megjelenésűek és a betegek anémiában szenvednek.

Az általunk vizsgált MDS RA betegcsoportban azt figyeltük meg, hogy a csontvelőből szeparált mononukleáris progenitorsejtek között nincs olyan populáció (7/7), melyben kimutatható lenne az Epo hormon ERK1/2-, valamint STAT-5-aktiváló hatása (legalábbis az általunk alkalmazott technikák segítségével). Ezzel szemben mind az egészséges csontvelő, mind a köldökszínór vér tartalmaz olyan eritroid sejthalakokat, amelyekben az Epo az ERK1/2 kinázok és a STAT-5 transzkripciós faktor aktiválására képes.

Az Epo-indukált ERK1/2 aktivitás hiánya mellett az MDS refrakter anémiában szenvedő betegek csontvelő biopsziás mintáiban az eritroid alakok fokozott jelenléte tapasztalható, ami arra utal, hogy az ERK1/2 kinázok megfelelő aktivációjának hiánya egy adott csontvelői elősejt szintjén kedvez az eritroid fejlődésnek bizonyos más sejttípusok rovására. Ezt alátámasztja az a megfigyelés is, hogy CD34⁺, humán köldökszínór vér eredetű primér sejt kultúrákban az ERK1/2 aktivitás gátlása következtében nő az eritroid kolóniák száma és mérete is (193). Figyelemre méltó ugyanakkor, hogy MDS RA betegekben az Epo indukált ERK1/2 és STAT-5 aktiváció hiányában is van vérképzés, azaz az említett szignalizációs zavar nem fatális.

MDS-es betegekből származó csontvelői progenitorokra általánosan jellemző az apoptotikus stimulusokra mutatott fokozott érzékenység. A legújabb vizsgálatok arra utalnak, hogy az MDS-es betegekben fellépő citopénia oka a kezdeti stádiumban nem az elégtelen hemopoézis, hanem a sejtek nagymértékű apoptózisa (125, 126). Az Epo-aktivált ERK1/2 és STAT-5 aktiváció szerepe a normál vérképzés során -MDS RA betegeken végzett vizsgálataink alapján- feltehetően a megfelelő eritroid progenitorok apoptózis gátlása, amely összhangban áll az Epo receptor szerkezetét érintő kutatások eredményeivel.

Az MDS RA esetében tapasztalt, Epo-indukált ERK1/2 és STAT-5 aktiváció hiányának hátterében két jelenség állhat:

a.) az MDS RA eritroid progenitorsejtek a teljes hosszúságú Epo receptor helyett/mellett nagy mennyiségben expresszálják a BFU-E progenitorokra jellemző -fiziológiásan létező- csonka Epo receptor formát. Az Epo R/T nem képes túlélési és mitogén szignálok közvetítésére, sőt a teljes hosszúságú Epo-R túlélést és sejtosztódást eredményező jeleit elnyomja, ha a két receptor típust egyidejűleg expresszáltatják (14). Elképzelhető, hogy az MDS RA patogenezisének hátterében azon splicing-mechanizmus

sérülése áll, mely a csonka EpoR-t követő hosszú EpoR kialakulásáért felel. Shimizu és munkatársai klinikai minták elemzésekor MDS-es betegek vizsgálata során 9-ből 7 esetben kizárólag a rövid Epo receptort tudták kimutatni a mintákban, ami az előző hipotézist alátámasztja (194).

b.) Elképzelhető az is, hogy az MDS RA háttérében az Epo receptor jelátvitelének sérülése áll, amelynek következtében az eritropoetin nem aktivál túléléshez és sejtszótódáshoz kapcsolható jelátviteli eseményeket.

A STAT-5 aktiválódását sok közleményben a citokin-közvetített túlélési jelpályák között említik (195, 196). Mielodiszplázias minták vizsgálata során már leírták a STAT-5 transzkripciós faktor Epo kezelésre mutatott válaszképtelenségét, azonban a választott betegcsoport heterogén volta miatt nem volt minden esetre jellemző ez a jelenség (az MDS ugyanis több fejlődési irányt is érinthet a csontvelőben). Megállapíthatjuk, hogy a jelen munka alapján –összhangban Hoefsloot és munkatársai vizsgálati eredményeivel (127)- a refrakter anémiával diagnosztizálható MDS-es betegekben kivétel nélkül sérül az Epo STAT-5 aktiváló képessége. Ez alapján a megfigyelt jelenség alkalmas lehet az MDS és a leukémiás transzformáció korai szakaszának diagnosztikai elkülönítésére. A STAT-5 aktiváció hiánya éppúgy felelőssé tehető az MDS-re jellemző fokozott csontvelői apoptózisért, mint a Fas/CD95 pro-apoptotikus fehérje fokozott expressziója (197, 198).

Az MDS gyakran AML, ritkán ALL akut leukémiákká alakul át. Az általunk vizsgált összes AML esetben citokin-stimulus hiányában is magas STAT-5 DNS-kötő aktivitást tapasztaltunk, melyet egyes esetekben a citokin stimulus még tovább fokozott. A szabályozatlan DNS-kötés háttérében konstitutív JAK2 kináz aktivitás állhat, esetleg elképzelhető a sejtek autokrin citokin-termelése is. A *JAK2* gén pszeudo-kináz doménjében bekövetkező V617F mutáció konstitutív JAK2 aktivitást eredményez és egyes mieloproliferatív megbetegedésekben a betegek döntő többségében megtalálható, ahol a különféle hemopoetikus sejthalakok fokozott proliferációjáért felel (124). A konstitutívvaló STAT-5 aktiváció eredményeképpen fokozódik egyes anti-apoptotikus és sejtciklust előre mozdító fehérjék expressziója, amelyek a leukémia kialakulásáért felelőssé tehetők (199).

Az irodalomból ismert, hogy az ERK MAPK útvonal fontos szerepet tölthet be a különféle hemopoetikus sejtek apoptózisának megakadályozásában –többek között- a Bcl-2 fehérje expressziójának fokozásán keresztül (54). Ez alapján valószínű, hogy az MDS RA-s betegekben, valamint az ugyancsak csonka Epo-receptort expresszáló TF-1 sejtekben az

Epo jelenlétében megfigyelhető apoptózis részben az ERK aktivitás hiánya miatt következik be.

A továbbiakban a betegekből szeparált mononukleáris csontvelői sejtek vizsgálata során annak a megfigyelését tűztük ki célul, hogy a *c-Fos* és az *Egr-1* azonnali korai válaszadó gének expressziójában megfigyelhető eltéréseknek lehet-e szerepe a mielodiszplázia patomechanizmusában, valamint az MDS/AML transzformáció illetve *de novo* akut mieloid leukémiák kialakulása során.

Normál csontvelői mintákon végzett analíziseink azt mutatták, hogy sem a GM-CSF, sem az Epo nem aktiválja az említett két transzkripció faktor fehérje mennyiségének kimutatható tartományba való emelkedését. Evvel szemben köldökzsinór vér eredetű mononukleáris sejtpopuláció esetében kezelés nélkül is kimutatható mennyiségű *c-Fos* és *Egr-1* fehérjét detektáltunk, melyek expressziója mind Epo, mind GM-CSF citokin stimulus hatására tovább emelkedett. Elképzelhető, hogy a tapasztalt jelenség hátterében a két sejtforrás eltérő mieloid progenitorsejt összetétele áll (175). Ezenkívül valószínű az is, hogy az említett két transzkripció faktor indukálhatósága nagymértékben összefügg avval, hogy a sejtek mekkora hányada található a sejtciklus S fázisában (176). Ez alapján elképzelhető, hogy a köldökzsinór vér esetlegesen egy citokin-indukált őssejt-mobilizációt követően preparált felnőtt csontvelőnek/perifériás vérnek feleltethető meg. Ismert, hogy a *c-Fos* fokozott expressziója bizonyos ciklinek (D1, E), ciklin dependens kinázok (pl. *cdk4*) és egyéb ciklin regulátorok (pl. *p16*) (176) expresszióját szabályozza. Mind a *c-Fos*, mind az *Egr-1* fehérjék jelenlétét ki tudtuk mutatni MDS alapon kialakult, illetve *de novo* létrejött akut mieloid leukémiás sejtekben, mely citokin stimulusra nem volt tovább fokozható. Mindebből arra következtethetünk, hogy valószínűleg egy normál csontvelői minta és egy köldökzsinór vér eredetű minta sejtciklus profilja teljesen különböző, mint ahogy elképzelhető, hogy különbözik az MDS-é és az akut leukémiáké is egymástól. A köldökzsinór vérben található késői stádiumú eritroblasztok esetében leírták, hogy az Epo átmenetileg növeli, majd csökkenti a ciklin D1 és D3 expresszióját (200). Fontos azonban megjegyezni, hogy a legtöbb (STAT-5-tel működő) I-es típusú citokin receptor esetében a ciklin D2 a legfőbb regulált ciklin (201). A ciklin G2 inhibítoros ciklin expressziója a nyugalmi állapotban levő sejtekben magas, mennyiségének csökkeni kell a ciklusba lépéshez. Az Epo a STAT-5 aktiválásán keresztül normális esetben a ciklin G2 szint csökkenéséhez vezet (202). Összefoglalva mind a *c-Fos*, mind a STAT-5 aktiváció fokozódása felelőssé tehető az akut leukémiáknál tapasztalható szabályozatlan

sejtosztódásért, valamint elképzelhető, hogy az Egr-1 fehérje is részt vesz ezekben a folyamatokban.

Az irodalmi adatok alapján a c-Fos expresszió nem egyformán jellemző minden akut leukémiára. Magas konstitutív c-Fos fehérje jelenlét mutatható ki monocita fenotípusú akut leukémiákban (FAB M4/M5), míg a *c-Fos* alacsony szintű expressziója jellemző az eritroleukémiákra (FAB 6) és az M1/M2/M3 akut mieloid leukémiákra (203). Egy másik tanulmány alapján morfológiailag elkülöníthetetlen leukémiák esetében is eltérő lehet a *c-Fos* expresszió mértéke (204). Az említett közleményekben nem vizsgálták a c-Fos expressziót a csontvelői %-os blaszt aránnyal összefüggésben. Vizsgálataink alapján az itt bemutatott eredmények alapján az állapítható meg, hogy azokban az akut leukémiákban, ahol a csontvelői blaszt arány nagyon magas volt (megközelítette a 100%-ot), a FAB típustól függetlenül magas és citokin-érzékeny c-Fos fehérje szintet találtunk, míg az említett hatás megszűnt a kemoterápiát követően.

Az AML kezelésében nem történt áttörés az elmúlt 20 évben, -többek között- mivel a betegség patomechanizmusa nem kellő képpen tisztázott. Az AML-ről elmondhatjuk, hogy a betegséget kezdeményező mutációk egyáltalán nem ismertek, a betegség során fellépő másodlagos mutációk (*FLT3*, *KIT* vagy *RAS* génekben) pedig nem jellemzőek minden AML esetre. Ebből kiindulva, a leukémia specifikus szomatikus mutációk felderítésére 2008-ban a Ley munkacsoport megszekvenált egy citogenetikailag negatív *de novo* AML genomot (M1) saját hám egészséges kontrollhoz viszonyítva (205). Vizsgálatuk 10 fehérje szomatikus mutációját írta le, melyek közül kettő volt csak korábban ismert és a tumor progresszióhoz kapcsolható. A többi nyolc mutációt –virtuálisan- minden tumorsejt tartalmazta és meglepő fehérjéket kódoltak: a proto-kadherin/kadherin család két tagját, G-fehérje kapcsolt receptorokat, egy foszfatazt, egy potenciális guanin nukleotid exchange faktort, egy peptid transzportert és egy glutamát receptort. Elmondható tehát, hogy a betegség kialakulása valószínűleg már a sejtfelszíni receptorok sérült működésével és a normálistól eltérő szignalizációval magyarázható, így továbbra is szükség lesz a leukémiás sejtpopulációk jelátviteli zavarainak pontosabb feltérképezésére, mely elvezethet ezen rosszindulatú betegségek hatékony kezeléséhez.

A Bcr/Abl fúziós tirozin kináz által aktivált jelpályák eritroid differenciációt befolyásoló szerepe *in vitro* vizsgálatához megfelelő modellrendszerként szolgálhat a CML eredetű *bcr-abl*⁺ K562 humán leukémia sejtvonal. Több adat is arra utal, hogy az eritroid

differentiációt az ERK aktivitás-csökkenése elősegíti (62, 206), ugyanakkor *Woessmann és mtsai.* eredményei azt mutatják, hogy az ERK fehérje aktivitása a differentiációt indukáló vegyülettől függően eltérő módon változhat (207, 208).

Előkísérleteink során megvizsgáltuk két - K562 sejtekben közismerten eritroid differentiációt indukáló vegyület- a nátrium-butirát és a hemin ERK1/2 aktivitásra gyakorolt hatását. Szemben az előbbi közleménnyel, mindkét vegyület esetében ERK1/2 kinázok egyensúlyi aktivitásának csökkenését tapasztaltuk. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a MEK1/2 kinázok farmakológiai gátlása hogyan befolyásolja K562 sejtek hemoglobin szintézisét. Eredményeink alapján az UO126 MEK1/2 inhibitor jelentősen fokozza a kezelt minták γ -globin mRNS tartalmát, amely esetünkben a kontrollban mérhető érték több, mint négyszeres emelkedését jelentette. Evvel megegyező változásokat kaptunk az említett kezelés hemoglobin fehérje mennyiségre gyakorolt hatásának benzidin reakción alapuló meghatározásakor is.

A Bcr-Abl tirozin kináz doménjének ATP-kötő zsebébe illeszkedve a fehérjét zárt, inaktív konformációban stabilizálja és ezáltal gátolja a működését (141). Kísérleteink során az irodalmi adatokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy Gleevec hatására jelentősen nő a K562 sejtek hemoglobin tartalma (209, 210). A Gleevec-indukált eritroid differentiáció során mi is megfigyeltük az ERK1/2 kinázok egyensúlyi aktivitásának csökkenését.

CML-es betegek perifériás véréből származó mintákban (211) és Bcr-Abl fehérjét expresszáló sejtvonalakban (212) exogén növekedési faktor hiányában is konstitutívan aktívak a STAT molekulacsalád egyes tagjai. A Bcr-Abl fehérje közvetlenül aktivál bizonyos STAT családba tartozó fehérjéket: a STAT-5-öt, a STAT-3-at és a STAT-1-et (213). A STAT molekulák szerepe a leukemogenezisben nem teljesen ismert. *In vitro* és *in vivo* kísérletekkel *Sexl és munkatársai* (214) bemutatták, hogy a STAT5 nem szükséges a Bcr-Abl indukált onkogén transzformáció kialakulásához. Evvel szemben, *Kato* eredményei alapján (215) a STAT3 aktiváció hemopoetikus őssejtek elkötelezett prekursor sejtekké alakulását segíti, azaz nem vesz részt a leukémiás transzformációban. A STAT-5 evvel szemben normál és a leukémiás HSC-k esetében is az önfenntartó osztódások fenntartásáért felelős, amely döntő jelentőségű lehet a mieloproliferatív rendellenességek kialakulásában.

K562 sejteken végzett kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a STAT-5 konstitutív módon aktív a kontroll tenyészetben. Az UO126 kezeléssel indukált eritroid differentiáció során nem tapasztaltuk a STAT-5 aktivitásának csökkenését. Evvel

szemben az apoptózist előidéző 0.5 μ M Gleevec kezelés hatására tartós ERK1/2-aktivitás gátlást és emellett tartós STAT-5 foszforiláció csökkenést tapasztaltunk. Kísérleti eredményeink alapján a STAT-5 aktiváció K562 sejtekben nem befolyásolja a hemoglobin szintézist, míg csökkenő aktivitása az apoptózisnak kedvez. Ez összhangban áll az irodalmi adatokkal, melyek alapján a STAT5 hozzájárul a *BCR-ABL*⁺ sejtek apoptózis-rezisztenciájának kialakításához, a korábban már említett anti-apoptotikus Bcl-Xl fehérje expressziójának szabályozásáig keresztül (83).

K562 sejteken végzett további kísérleteink során megállapítottuk, hogy 5 μ M UO126 MEK1/2 inhibitorral való kezelés annak ellenére, hogy önmagában megemeli a sejtek hemoglobin tartalmát, nem okoz mérhető proliferációs hátrányt a kezeltlen kontroll sejtekhez képest. Evvel szemben 0,5 μ M Gleevec hatásra a differenciációt sejtpusztulás is kíséri. Az ERK1/2 aktivitás időbeli követésével megállapítottuk, hogy a MEK inhibitor átmenetileg csökkenti az ERK1/2 foszforilációt, azonban ez a hatás is 24 órán keresztül mérhető különbséget eredményez a kezeltlen kontrollhoz képest, azaz még ennyi ideig tartó csökkent ERK1/2 aktivitás esetén sincs számottevő proliferációs hátrányuk az UO126-tal kezelt K562 sejteknek.

További munkánk során a Bcr/Abl-t célzó retrovirális siRNS konstrukció alkalmazásával az elsődleges célunk annak megállapítása volt, hogy a differenciáció és az apoptózis milyen összefüggésben áll K562 sejtekben, azaz a konstitutív tirozin kináz hiányában feltétlenül bekövetkezik-e a globin gének fokozott expressziója.

Kísérleteink alapján a Bcr/Abl fehérjeszint csökkentését célzó retrovirális vektor még 90% fölötti transzdukciós hatékonyság esetén sem eredményezett számottevő sejtpusztulást. Ennek ellenére megállapítottuk, hogy a fúziós tirozin kináz mennyiségének átmeneti csökkentésével előidézett tranziens ERK1/2 aktivitás csökkenés úgy is biztosítja a hemoglobin szintézis növekedését, hogy közben nem befolyásolja szignifikáns mértékben sem a sejtek proliferatív kapacitását, sem azok életképességét. Említésre méltó, hogy az általunk alkalmazott K562 sejtvonal Fluoreszcens In Situ Hibridizációja során (Kozma András munkája) legalább 10 kópiában tartalmazta a fúziós gént, amely valószínűleg megakadályozta az általunk használt retrovirális konstrukció hatékony apoptotikus hatását. Evvel összhangban más munkacsoport is megállapította, hogy a Bcr/Abl siRNS-közvetített hatékony csendesítéséhez legalább genomként 4 integrálódó lentivirális konstrukció szükséges, különben újra felnőnek a sejtek (216).

Ezek alapján úgy tűnik, hogy az ERK1/2 kinázok K562 sejtekben mindenképp a differenciálatlan fenotípus fennartásáért felelnek. Kang és munkatársai eredményei alapján az ERK kinázok és MAPK foszfatázok megfelelő egyensúlyi működésére van szükség ahhoz, hogy a differenciáció létrejöhesen (217).

A Gleevec kezelés által indukált differenciáció és az apoptózis egyidejűleg bekövetkező, egymástól el nem választható folyamatok CML eredetű sejtekben (209). Az általunk bemutatott eredmények ezzel szemben bizonyítékok szolgálnak arra, hogy az apoptózis és az eritroid differenciáció egymástól tökéletesen szétválasztható folyamatok K562 sejtek γ -globin expresszióját tekintve. Említésre méltó továbbá, hogy az ERK aktiváció gátlása nem idézi elő az anti-apoptotikus Bcl-xL fehérje mennyiségének csökkenését és a kaszpáz-3 aktivációját sem az említett sejtvonal esetében. Ezen megállapításunkat később mások is megerősítették (218).

Összegezve a dolgozatban bemutatott munkánk eredményeit elképzelhető, hogy bizonyos –feltehetően nagyon korai- csontvelői progenitorok illetve egyes leukémia típusok esetében az eritroid irányú differenciáció elengedhetetlen feltétele az ERK1/2 kinázok alacsony egyensúlyi aktivitása. Hasonlóan a kutatócsoportunk által korábban megfigyelt c-Myb down-regulációhoz, az ERK1/2 aktivitás indukálószer hatására bekövetkező csökkenése általános mechanizmusa lehet a hemoglobin fehérje megjelenésével jellemezhető eritroid differenciációnak. Mindezek alapján elképzelhető, hogy a Raf/MEK/ERK1/2 MAPK útvonal hemopoetikus sejtekben egy olyan fejlődési irányt meghatározó gén-regulátor rendszert szabályoz, amely megakadályozza az eritroid-specifikus gének kifejeződését.

Az ERK1/2 aktivitás eritroid differenciációt gátló hatása valószínűleg nem csak leukémiás sejtmodellek esetében érvényes, ugyanis a Raf-1 kináz deficiens egerek eritroblasztjai nem tenyésztethetők *ex vivo*, mivel sejt-autonóm módon, folyamatosan érett vörösvértestekké alakulnak (219). A fenti hipotézis alapján figyelemre méltó az a megfigyelés is, hogy a MEK gátlása fokozza a CD34 pozitív humán hemopoetikus progenitor sejtekből kialakuló eritroid kolóniák számát és méretét (193).

Az, hogy az ERK1/2 aktivitás milyen mechanizmus révén befolyásolhatja az eritroid érést, máig nincs tisztázva. Elképzelhető, hogy az ERK1/2 kinázok az általuk aktivált transzkripciós faktorok közvetítésével olyan fehérjék expresszióját fokozzák, melyek transzkripcionális szinten gátolják a differenciációt. MEL sejtekben megfigyelték, hogy eritroid differenciáció során megnövekszik a Tel-1 -ERK1/2 kinázok által szabályozott-

transzkripcionális represszor funkcionális aktivitása, amelyet az említett transzkripció faktor az Ets kötőhelyet tartalmazó gének promóter szakaszán fejt ki. Tehát az ERK aktivitás csökkenésének hatására megnő egy olyan represszor fehérje aktivitása, amely túléléshez és sejtosztódáshoz kapcsolható gének működését gátolja (220). Elképzelhető az is, hogy a sejtmagba transzlokálódó aktív ERK1/2 kinázok a magi PLC β 1 aktiválásán keresztül a p45/NF-E2 eritroid specifikus transzkripció faktor expresszióját gátolják. Ez utóbbi a globin gének aktivációjához szükséges {Manzoli, 2004 #755; Faenza, 2002 #756(221, 222)}.

A dolgozatban bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy az ERK1/2 aktivitás farmakológiai gátlásának nincs drámai hatása az általunk vizsgált leukémiás sejtek életképességére olyan esetekben, amikor a sejtek túlélését és osztódását számos, egymás mellett működő jelátviteli kaszkád biztosítja (mint például TF-1 sejtekben a GM-CSF receptor közvetítésével aktiválódó útvonalak vagy K562 sejtekben a Bcr-Abl fehérjéről induló útvonalak esetében). Az irodalmi adatok alapján az ERK MAPK útvonal túlzott aktivitása fontos eleme az onkogén transzformációnak; a Ras és a Raf mutációi bizonyos tumor típusok (például hasnyálmirigy rák, pajzsmirigy rák) jelentős százalékában megtalálhatóak (223, 224). A kis molekulatömegű MEK inhibitorok potenciális rák ellenes gyógyszerek és II. stádiumú klinikai kipróbálás alatt állnak {Friday, 2008 #145}. Annak ellenére, hogy a tesztelt inhibitorok mind a tumorokban, mind a betegek perifériás vér mononukleáris sejtjeiben az ERK 1/2 kinázok hatékony gátlását eredményezik, általános anti-tumor hatásuk mérsékeltnek mondható. Ezek a klinikai tapasztalatok alátámasztják azt az álláspontot, amely szerint több jelátviteli útvonal rendellenes aktivitása együtt felel a transzformált fenotípus kialakulásáért..

Mindezek alapján a dolgozatban bemutatott kísérleti eredmények jelentősen elősegíthetik a normális és kóros eritropoézis jelátviteli mechanizmusainak jobb megértését.

6. A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- TF-1 humán eritroleukémia sejtekben az eritropoetin (Epo) nem képes a differenciáció elindítására a GM-CSF növekedési faktor jelenlétében. Ezzel szemben az ERK1/2 kinázok farmakológiai gátlása önmagában fokozza TF-1 sejtek hemoglobin szintézisét.

- A differenciációra alkalmas kísérleti körülmények között az Epo nem védi meg a sejteket a GM-CSF megvonás által előidézett apoptózistól.
- A GM-CSF az önfenntartó osztódások során aktiválja a Raf/MEK/ERK/Elk-1 MAP kináz útvonalat, a *c-Fos* és az *Egr-1* azonnali korai válaszadó gének átírását, valamint az Egr-1, az AP-1, az NF- κ B, a c-Myb és a STAT-5 transzkripciós faktorok DNS-kötő képességét. Ezzel ellentétben, az eritropoetin a túléléshez és proliferációhoz kapcsolható jelpályákat nem aktiválja, és a GM-CSF éppen a fenti útvonalak aktiválásán keresztül gátolja az Epo hatására végbemenő differenciációt.
- A TF-1 sejtekben az intracelluláris kalcium szint emelése megakadályozza az eritropoetinnel előidézett differenciációt, mivel aktiválja az ERK1/2 MAP kinázokat.
- Az intracelluláris kalcium szint megemelése TF-1 sejtekben GM-CSF független túlélést és osztódást eredményez, amely kizárólag az ERK1/2 kinázok aktivitásától függ.
Összefoglalva megállapítható, hogy az osztódásához és túléléséhez vezető jelátvivő útvonalak aktivitása nem csak hogy nem szükséges az Epo-indukált eritroid differenciáció létrejöttéhez TF-1 sejtekben, hanem kifejezetten gátolják azt. A TF-1 sejtek Epo-receptora működési mechanizmusát tekintve megegyezik a legkorábbi eritroid előalakokra jellemző, rövid Epo receptor variánssal. Ez utóbbi nem közvetít túlélési és növekedési jeleket, hanem kizárólag a differenciációt segíti elő.
- A mielodiszplázia (MDS) betegség refrakter anémia típusával diagnosztizált betegek csontvelői mononukleáris sejt mintáiban az Epo nem aktiválja a STAT-5 és ERK1/2 útvonalakat, ami megmagyarázhatja a betegségre jellemző vérszegénységet.
- Az MDS akut leukémiává alakulását követően, a felszaporodó leukémiás sejtekben mind a STAT-5 aktiváció, mind a c-Fos és az Egr-1 transzkripciós faktorok expressziója fokozottá válik és kiesik a citokinek szabályozása alól. Ez hozzájárulhat a leukémiákra jellemző szabályozatlan sejtosztódás létrejöttéhez, valamint szerepet játszhat bizonyos differenciációs folyamatok sérülésében is.
- MDS RA esetén minden vizsgált esetben elmarad az eritropoetin stimulust követő STAT-5 aktiváció, míg az MDS akut leukémiává való transzformációját követően minden mintára jellemző a citokin független, konstitutív STAT-5 DNS-kötés.
A fenti megfigyelések hozzásegíthetnek az MDS és az AML transzformáció korai, csontvelői szakaszának elkülönítésére szolgáló, kiegészítő diagnosztikai eljárások kifejlesztéséhez.

- Philadelphia kromoszóma pozitív, krónikus mieloid leukémia eredetű K562 sejtekben az ERK1/2 aktivitás gátlása fokozott hemoglobin szintézishez vezet, anélkül hogy növekedési hátrányt vagy apoptózist okozna.
- A Bcr-Abl fúziós fehérjét célzó siRNsek konstitutív retrovirális termeltetése nem eredményezi a K562 sejtek pusztulását még 90% fölötti transzdukciós hatékonyság esetén sem, azonban elegendő a Bcr-Abl szint átmeneti csökkentéséhez és a differenciáció indukciójához.

A fentiek alapján K562 sejtekben az ERK1/2 kinázok egyensúlyi aktivitásának csökkenése minden esetben a hemoglobin szintézis fokozódásához vezet. A differenciáció és az apoptotikus folyamatok egymástól teljes mértékben elválasztható folyamatok az említett sejttípus esetében.

7. A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

Kolonics A, Apáti A, Jánosy J, Brózik A, Gáti R, Schaefer A, Magócsi M. Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. [*Cell Signal.* 2001. 13\(10\):743-54.](#)

Apáti A, Jánosy J, Brózik A, Bauer PI, Magócsi M. Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1. [*J Biol Chem.* 2003. 278\(11\):9235-43.](#)

Kolonics A, Apáti A, Nahajevszky S, Gáti R, Brózik A, Magócsi M. Unregulated activation of STAT-5, ERK1/2 and c-Fos may contribute to the phenotypic transformation from myelodysplastic syndrome to acute leukaemia. [*Haematologia \(Budap\).* 2001. 31\(2\):125-38.](#)

Brózik A, Casey NP, Hegedus C, Bors A, Kozma A, Andrikovics H, Geiszt M, Német K, Magócsi M. Reduction of Bcr-Abl function leads to erythroid differentiation of K562 cells via downregulation of ERK. [*Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1090:344-54.](#)

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségért köszönettel tartozom a Moleuklális Sejtbiológia Osztály minden munkatársának azért a kivételesen baráti légkörért, amellyel mindvégig körülvettek.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Magócsi Máriának**, hogy munkámat önzetlenül segítette, megosztva velem kutatói tapasztalatát.

Köszönöm **Dr. Sarkadi Balázsnak** irántam tanúsított töretlen bizalmát és támogatását.

Köszönöm **Apáti Ágota, Jánossy Judit, Nahajevszky Sarolta, Kolonics Attila, Bors András, Nicholas Casey és Hegedüs Csilla** munkáját, amivel hozzájárultak közös eredményeink tudományos színvonalához.

Köszönöm tanárainnak, hogy felkeltették érdeklődésemet a természettudományok iránt. Külön köszönöm Rákóczy Gizellának a rendszerszintű gondolkodás elsajátításában nyújtott segítségét.

Végül szeretném hálás köszönetemet kifejezni Szüleimnek és Férjemnek, akik támogató szeretete nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.



1. Rizo, A., Vellenga, E., de Haan, G., and Schuringa, J. J. (2006) Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R210-219
2. Buza-Vidas, N., Luc, S., and Jacobsen, S. E. (2007) Delineation of the earliest lineage commitment steps of haematopoietic stem cells: new developments, controversies and major challenges. *Curr Opin Hematol* 14, 315-321
3. Hillman, R. S., and Finch, C. A. (1971) Erythropoiesis. *N Engl J Med* 285, 99-101
4. Krantz, S. B. (1991) Erythropoietin. *Blood* 77, 419-434
5. Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J., and Semenza, G. L. (1991) Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 77, 2497-2503
6. Koury, S. T., Bondurant, M. C., and Koury, M. J. (1988) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71, 524-527
7. Koury, M. J., Bondurant, M. C., Graber, S. E., and Sawyer, S. T. (1988) Erythropoietin messenger RNA levels in developing mice and transfer of 125I-erythropoietin by the placenta. *J Clin Invest* 82, 154-159
8. Koury, M. J., and Bondurant, M. C. (1988) Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J Cell Physiol* 137, 65-74
9. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H. F. (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67
10. Lin, C. S., Lim, S. K., D'Agati, V., and Costantini, F. (1996) Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 10, 154-164
11. Richmond, T. D., Chohan, M., and Barber, D. L. (2005) Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15, 146-155
12. Chasis, J. A., and Mohandas, N. (2008) Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112, 470-478
13. Goldfarb, A. N., Wong, D., and Racke, F. K. (2001) Induction of megakaryocytic differentiation in primary human erythroblasts: a physiological basis for leukemic lineage plasticity. *Am J Pathol* 158, 1191-1198
14. Nakamura, Y., and Nakauchi, H. (1994) A truncated erythropoietin receptor and cell death: a reanalysis. *Science* 264, 588-589
15. Kelley, L. L., Koury, M. J., Bondurant, M. C., Koury, S. T., Sawyer, S. T., and Wickrema, A. (1993) Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood* 82, 2340-2352
16. van Leyen, K., Duvoisin, R. M., Engelhardt, H., and Wiedmann, M. (1998) A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 395, 392-395
17. Wagner, K. U., Claudio, E., Rucker, E. B., 3rd, Riedlinger, G., Broussard, C., Schwartzberg, P. L., Siebenlist, U., and Hennighausen, L. (2000) Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development* 127, 4949-4958

18. Sawada, K., Krantz, S. B., Dai, C. H., Koury, S. T., Horn, S. T., Glick, A. D., and Civin, C. I. (1990) Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol* 142, 219-230
19. Wickrema, A., Krantz, S. B., Winkelmann, J. C., and Bondurant, M. C. (1992) Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* 80, 1940-1949
20. Taga, T., and Kishimoto, T. (1992) Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb J* 6, 3387-3396
21. Wojchowski, D. M., Gregory, R. C., Miller, C. P., Pandit, A. K., and Pircher, T. J. (1999) Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 253, 143-156
22. Koury, M. J., Sawyer, S. T., and Brandt, S. J. (2002) New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 9, 93-100
23. Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P. A., and Ihle, J. N. (2001) The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. *Embo J* 20, 3156-3166
24. Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281-1283
25. Verdier, F., Rabionet, R., Gouilleux, F., Beisenherz-Huss, C., Varlet, P., Muller, O., Mayeux, P., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Chretien, S. (1998) A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 18, 5852-5860
26. Mui, A. L., Wakao, H., Kinoshita, T., Kitamura, T., and Miyajima, A. (1996) Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *Embo J* 15, 2425-2433
27. Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H. F. (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-} Stat5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 98, 181-191
28. Matsumura, I., Kitamura, T., Wakao, H., Tanaka, H., Hashimoto, K., Albanese, C., Downward, J., Pestell, R. G., and Kanakura, Y. (1999) Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *Embo J* 18, 1367-1377
29. Ofir, R., Qing, W., Krup, M., and Weinstein, Y. (1997) Identification of genes induced by interleukin-3 and erythropoietin via the Jak-Stat5 pathway using enhanced differential display-reverse southern. *J Interferon Cytokine Res* 17, 279-286
30. Mochizuki, T., Kitanaka, C., Noguchi, K., Muramatsu, T., Asai, A., and Kuchino, Y. (1999) Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 18659-18666
31. Levenson, J. D., Koskinen, P. J., Orrico, F. C., Rainio, E. M., Jalkanen, K. J., Dash, A. B., Eisenman, R. N., and Ness, S. A. (1998) Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol Cell* 2, 417-425
32. Lilly, M., and Kraft, A. (1997) Enforced expression of the Mr 33,000 Pim-1 kinase enhances factor-independent survival and inhibits apoptosis in murine myeloid cells. *Cancer Res* 57, 5348-5355

33. Moon, J. J., Rubio, E. D., Martino, A., Krumm, A., and Nelson, B. H. (2004) A permissive role for phosphatidylinositol 3-kinase in the Stat5-mediated expression of cyclin D2 by the interleukin-2 receptor. *J Biol Chem* 279, 5520-5527
34. Gobert, S., Chretien, S., Gouilleux, F., Muller, O., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Groner, B., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Mayeux, P. (1996) Identification of tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor crucial for STAT5 activation. *Embo J* 15, 2434-2441
35. Iwatsuki, K., Endo, T., Misawa, H., Yokouchi, M., Matsumoto, A., Ohtsubo, M., Mori, K. J., and Yoshimura, A. (1997) STAT5 activation correlates with erythropoietin receptor-mediated erythroid differentiation of an erythroleukemia cell line. *J Biol Chem* 272, 8149-8152
36. Gregory, R. C., Jiang, N., Todokoro, K., Crouse, J., Pacifici, R. E., and Wojchowski, D. M. (1998) Erythropoietin receptor and STAT5-specific pathways promote SKT6 cell hemoglobinization. *Blood* 92, 1104-1118
37. Chretien, S., Varlet, P., Verdier, F., Gobert, S., Cartron, J. P., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Lacombe, C. (1996) Erythropoietin-induced erythroid differentiation of the human erythroleukemia cell line TF-1 correlates with impaired STAT5 activation. *Embo J* 15, 4174-4181
38. Chang, L., and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40
39. Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912
40. Marshall, M. S. (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *Faseb J* 9, 1311-1318
41. Leever, S. J., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369, 411-414
42. Zheng, C. F., and Guan, K. L. (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J* 13, 1123-1131
43. Butch, E. R., and Guan, K. L. (1996) Characterization of ERK1 activation site mutants and the effect on recognition by MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 271, 4230-4235
44. Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 10, 885-892
45. Roovers, K., and Assoian, R. K. (2000) Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 22, 818-826
46. Barber, D. L., Corless, C. N., Xia, K., Roberts, T. M., and D'Andrea, A. D. (1997) Erythropoietin activates Raf1 by an Shc-independent pathway in CTLL-EPO-R cells. *Blood* 89, 55-64
47. Mason, C., Lake, M., Nebreda, A., and Old, R. (1996) A novel MAP kinase phosphatase is localised in the branchial arch region and tail tip of *Xenopus* embryos and is inducible by retinoic acid. *Mech Dev* 55, 133-144
48. Tauchi, T., Damen, J. E., Toyama, K., Feng, G. S., Broxmeyer, H. E., and Krystal, G. (1996) Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. *Blood* 87, 4495-4501
49. Bouscary, D., Pene, F., Claessens, Y. E., Muller, O., Chretien, S., Fontenay-Roupie, M., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Lacombe, C. (2003) Critical role for

- PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 101, 3436-3443
50. Chen, C., and Sytkowski, A. J. (2001) Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem* 276, 38518-38526
 51. Komatsu, N., Adamson, J. W., Yamamoto, K., Altschuler, D., Torti, M., Marzocchini, R., and Lapetina, E. G. (1992) Erythropoietin rapidly induces tyrosine phosphorylation in the human erythropoietin-dependent cell line, UT-7. *Blood* 80, 53-59
 52. Todokoro, K., Sugiyama, M., Nishida, E., and Nakaya, K. (1994) Activation of mitogen-activated protein kinase cascade through erythropoietin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 1912-1919
 53. Sui, X., Krantz, S. B., and Zhao, Z. J. (2000) Stem cell factor and erythropoietin inhibit apoptosis of human erythroid progenitor cells through different signalling pathways. *Br J Haematol* 110, 63-70
 54. Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K., and Miyajima, A. (1995) Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* 10, 2207-2212
 55. Fang, X., Yu, S., Eder, A., Mao, M., Bast, R. C., Jr., Boyd, D., and Mills, G. B. (1999) Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 18, 6635-6640
 56. Smithgall, T. E. (1998) Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation. *Pharmacol Rev* 50, 1-19
 57. Crompton, T., Gilmour, K. C., and Owen, M. J. (1996) The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* 86, 243-251
 58. Kharbanda, S., Saleem, A., Emoto, Y., Stone, R., Rapp, U., and Kufe, D. (1994) Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinases during monocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 269, 872-878
 59. Whalen, A. M., Galasinski, S. C., Shapiro, P. S., Nahreini, T. S., and Ahn, N. G. (1997) Megakaryocytic differentiation induced by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Cell Biol* 17, 1947-1958
 60. Hsu, C. L., Kikuchi, K., and Kondo, M. (2007) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway is involved in myeloid lineage commitment. *Blood* 110, 1420-1428
 61. Matsuzaki, T., Aisaki, K., Yamamura, Y., Noda, M., and Ikawa, Y. (2000) Induction of erythroid differentiation by inhibition of Ras/ERK pathway in a friend murine leukemia cell line. *Oncogene* 19, 1500-1508
 62. Kawano, T., Horiguchi-Yamada, J., Iwase, S., Furukawa, Y., Kano, Y., and Yamada, H. (2004) Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. *Mol Cell Biochem* 258, 25-33
 63. Schaefer, A., Kosa, F., Bittorf, T., Magocsi, M., Rosche, A., Ramirez-Chavez, Y., Marotzki, S., and Marquardt, H. (2004) Opposite effects of inhibitors of mitogen-activated protein kinase pathways on the egr-1 and beta-globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. *Cell Signal* 16, 223-234
 64. Zhang, J., and Lodish, H. F. (2004) Constitutive activation of the MEK/ERK pathway mediates all effects of oncogenic H-ras expression in primary erythroid progenitors. *Blood* 104, 1679-1687

65. Schaefer, A., Magocsi, M., Stocker, U., Fandrich, A., and Marquardt, H. (1996) Ca²⁺/calmodulin-dependent and -independent down-regulation of c-myb mRNA levels in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. The role of calcineurin. *J Biol Chem* 271, 13484-13490
66. Cheung, J. Y., and Miller, B. A. (2001) Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron* 87, 215-222
67. Chu, X., Cheung, J. Y., Barber, D. L., Birnbaumer, L., Rothblum, L. I., Conrad, K., Abrasonis, V., Chan, Y. M., Stahl, R., Carey, D. J., and Miller, B. A. (2002) Erythropoietin modulates calcium influx through TRPC2. *J Biol Chem* 277, 34375-34382
68. Schaefer, A., Magocsi, M., Stocker, U., Kosa, F., and Marquardt, H. (1994) Early transient suppression of c-myb mRNA levels and induction of differentiation in Friend erythroleukemia cells by the [Ca²⁺]_i-increasing agents cyclopiazonic acid and thapsigargin. *J Biol Chem* 269, 8786-8791
69. Magocsi, M., Apati, A., Gati, R., and Kolonics, A. (1999) Signalling mechanisms and the role of calcineurin in erythropoiesis. *Immunol Lett* 68, 187-195
70. Schaefer, A., Magocsi, M., and Marquardt, H. (1997) Signalling mechanisms in erythropoiesis: the enigmatic role of calcium. *Cell Signal* 9, 483-495
71. Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., and Lodish, H. F. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80, 729-738
72. Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C. D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D. M., and Penninger, J. M. (2001) CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349-354
73. Myers, M. P., Andersen, J. N., Cheng, A., Tremblay, M. L., Horvath, C. M., Parisien, J. P., Salmeen, A., Barford, D., and Tonks, N. K. (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276, 47771-47774
74. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308
75. Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470
76. Bitko, V., and Barik, S. (2001) An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J Cell Biochem* 80, 441-454
77. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290
78. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., and et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43
79. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., and Wang, X. (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* 274, 13836-13840
80. Rao, L., Perez, D., and White, E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-1455

81. Wang, K. K., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R. V., Glantz, S. B., and Morrow, J. S. (1998) Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273, 22490-22497
82. Cory, S., and Adams, J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656
83. Horita, M., Andreu, E. J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., and Fernandez-Luna, J. L. (2000) Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 191, 977-984
84. Boucher, M. J., Morisset, J., Vachon, P. H., Reed, J. C., Laine, J., and Rivard, N. (2000) MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79, 355-369.
85. Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362
86. Chambeyron, S., and Bickmore, W. A. (2004) Does looping and clustering in the nucleus regulate gene expression? *Curr Opin Cell Biol* 16, 256-262
87. Fraser, P. (2006) Transcriptional control thrown for a loop. *Curr Opin Genet Dev* 16, 490-495
88. Blobel, G. A. (2000) CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* 95, 745-755
89. Blick, M., Westin, E., Gutterman, J., Wong-Staal, F., Gallo, R., McCredie, K., Keating, M., and Murphy, E. (1984) Oncogene expression in human leukemia. *Blood* 64, 1234-1239
90. Duprey, S. P., and Boettiger, D. (1985) Developmental regulation of c-myc in normal myeloid progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6937-6941
91. Shen-Ong, G. L., Skurla, R. M., Jr., Owens, J. D., and Mushinski, J. F. (1990) Alternative splicing of RNAs transcribed from the human c-myc gene. *Mol Cell Biol* 10, 2715-2722
92. Cole, M. D. (1986) The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 20, 361-384
93. Schaefer, A., Stocker, U., and Marquardt, H. (1993) Calcium ionophore-induced transient down-regulation of c-myc mRNA levels in Friend erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 268, 10876-10880
94. Shivdasani, R. A., and Orkin, S. H. (1996) The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87, 4025-4039
95. Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, A. B., Swerdlow, S. H., Schreiner, C. M., Miller, T. A., Pietryga, D. W., Scott, W. J., Jr., and Potter, S. S. (1991) A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677-689
96. Melotti, P., and Calabretta, B. (1996) Induction of hematopoietic commitment and erythromyeloid differentiation in embryonal stem cells constitutively expressing c-myc. *Blood* 87, 2221-2234
97. Patel, H. R., Choi, H. S., and Sytkowski, A. J. (1992) Activation of two discrete signaling pathways by erythropoietin. *J Biol Chem* 267, 21300-21302
98. Csar, X. F., Ward, A. C., Hoffmann, B. W., Guy, G. G., and Hamilton, J. A. (1997) cAMP suppresses p21ras and Raf-1 responses but not the Erk-1 response to

- granulocyte-colony-stimulating factor: possible Raf-1-independent activation of Erk-1. *Biochem J* 322 (Pt 1), 79-87
99. Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J., and Cochran, B. H. (1990) The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *Embo J* 9, 4477-4484
 100. Rajotte, D., Sadowski, H. B., Haman, A., Gopalbhai, K., Meloche, S., Liu, L., Krystal, G., and Hoang, T. (1996) Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 88, 2906-2916
 101. Umemura, T., Umene, K., Takahira, H., Takeichi, N., Katsuno, M., Fukumaki, Y., Nishimura, J., Sakaki, Y., and Ibayashi, H. (1988) Hematopoietic growth factors (BPA and Epo) induce the expressions of c-myc and c-fos proto-oncogenes in normal human erythroid progenitors. *Leuk Res* 12, 187-194
 102. Tsuda, H., Aso, N., Sawada, T., Hata, H., Kawakita, M., Mori, K. J., and Takatsuki, K. (1991) Alteration of nuclear proto-oncogene expression by erythropoietin (Epo) in Epo-responsive murine cell lines. *Int J Cell Cloning* 9, 123-133
 103. Patel, H. R., and Sytkowski, A. J. (1995) Erythropoietin activation of AP1 (Fos/Jun). *Exp Hematol* 23, 619-625
 104. Treisman, R. (1995) Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *Embo J* 14, 4905-4913
 105. Velcich, A., and Ziff, E. B. (1990) Functional analysis of an isolated fos promoter element with AP-1 site homology reveals cell type-specific transcriptional properties. *Mol Cell Biol* 10, 6273-6282
 106. Lee, G., and Gilman, M. (1994) Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells. *Mol Cell Biol* 14, 4579-4587
 107. Bading, H., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260, 181-186
 108. De Cesare, D., Vallone, D., Caracciolo, A., Sassone-Corsi, P., Nerlov, C., and Verde, P. (1995) Heterodimerization of c-Jun with ATF-2 and c-Fos is required for positive and negative regulation of the human urokinase enhancer. *Oncogene* 11, 365-376
 109. Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E., and Leder, P. (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924
 110. Hawker, K. L., Vass, J. K., and Ozanne, B. W. (1996) Isolation of novel, transcriptionally active AP-1 binding sites: implications for cellular transformation. *Oncogene* 13, 283-292
 111. Angel, P., and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072, 129-157
 112. Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270, 16483-16486
 113. Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74, 589-607
 114. Johnson, C. M., Hill, C. S., Chawla, S., Treisman, R., and Bading, H. (1997) Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci* 17, 6189-6202

115. Min, I. M., Pietramaggiore, G., Kim, F. S., Passegue, E., Stevenson, K. E., and Wagers, A. J. (2008) The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 380-391
116. Krishnaraju, K., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2001) Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* 97, 1298-1305
117. Virolle, T., Krones-Herzig, A., Baron, V., De Gregorio, G., Adamson, E. D., and Mercola, D. (2003) Egr1 promotes growth and survival of prostate cancer cells. Identification of novel Egr1 target genes. *J Biol Chem* 278, 11802-11810
118. Sperandio, S., Fortin, J., Sasik, R., Robitaille, L., Corbeil, J., and de Belle, I. (2009) The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1 α gene during hypoxia. *Mol Carcinog* 48, 38-44
119. Hatada, E. N., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2000) NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12, 52-58
120. Zhang, M. Y., Sun, S. C., Bell, L., and Miller, B. A. (1998) NF-kappaB transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood* 91, 4136-4144
121. Bittorf, T., Buchse, T., Sasse, T., Jaster, R., and Brock, J. (2001) Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell Signal* 13, 673-681
122. Liu, J. J., Hou, S. C., and Shen, C. K. (2003) Erythroid gene suppression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 278, 19534-19540
123. Garay, C. A., Al-Saleem, T., Testa, J. R., and Smith, M. R. (1999) Coexisting myelodysplasia and myeloproliferative features in a single clone containing 5q-, Ph and i(17q). *Leuk Res* 23, 965-967
124. Matolcsy András, U. M., Kopper László (2006) *Hematológiai betegségek atlasza*, Medicina, Budapest
125. Greenberg, P. L. (1998) Risk factors and their relationship to prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 22 Suppl 1, S3-6
126. Parker, J. E., and Mufti, G. J. (1998) Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 101, 220-230
127. Hoefsloot, L. H., van Amelsvoort, M. P., Broeders, L. C., van der Plas, D. C., van Lom, K., Hoogerbrugge, H., Touw, I. P., and Lowenberg, B. (1997) Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome. *Blood* 89, 1690-1700
128. Hellstrom-Lindberg, E. (1995) Efficacy of erythropoietin in the myelodysplastic syndromes: a meta-analysis of 205 patients from 17 studies. *Br J Haematol* 89, 67-71
129. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y. F., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140, 323-334
130. Kitamura, T., Tojo, A., Kuwaki, T., Chiba, S., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989) Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1. *Blood* 73, 375-380
131. Ward, J. C., Harris, K. W., Penny, L. A., Forget, B. G., Kitamura, T., and Winkelmann, J. C. (1992) A structurally abnormal erythropoietin receptor gene in a human erythroleukemia cell line. *Exp Hematol* 20, 371-373
132. Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G. S., Bench, A. J., Boyd, E. M., Curtin, N., Scott, M. A., Erber, W. N.,

- and Green, A. R. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061
133. James, C., Ugo, V., Le Couedic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J. L., Constantinescu, S. N., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148
 134. Lozzio, C. B., and Lozzio, B. B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334
 135. Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G., and Feliu, A. S. (1981) A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 166, 546-550
 136. Deininger, M. W., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2000) BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 60, 2049-2055
 137. Danial, N. N., and Rothman, P. (2000) JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 19, 2523-2531
 138. Cortez, D., Reuther, G., and Pendergast, A. M. (1997) The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15, 2333-2342
 139. Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J. K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T. O., Wasik, M. A., Tsichlis, P. N., and Calabretta, B. (1997) Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *Embo J* 16, 6151-6161
 140. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N. B. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561-566
 141. Lydon, N. B., and Druker, B. J. (2004) Lessons learned from the development of imatinib. *Leuk Res* 28 Suppl 1, S29-38
 142. Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L., and Druker, B. J. (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99, 3530-3539
 143. Gambacorti-Passerini, C. B., Gunby, R. H., Piazza, R., Galiotta, A., Rostagno, R., and Scapozza, L. (2003) Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol* 4, 75-85
 144. Smith, D. L., Burthem, J., and Whetton, A. D. (2003) Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukaemia. *Expert Rev Mol Med* 5, 1-27
 145. Kurzrock, R., Kantarjian, H. M., Druker, B. J., and Talpaz, M. (2003) Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138, 819-830
 146. Van Etten, R. A. (2004) Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leuk Res* 28 Suppl 1, S21-28

147. Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M. Z., Wen, S. C., Zon, G., Gewirtz, A. M., Perussia, B., and Calabretta, B. (1995) Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86, 726-736
148. Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M. A., Pisick, E., Xu, G., Li, J. L., Prasad, K. V., and Griffin, J. D. (1996) The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12, 839-846
149. Sawyers, C. L., McLaughlin, J., and Witte, O. N. (1995) Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181, 307-313
150. Tsiftoglou, A. S., Pappas, I. S., and Vizirianakis, I. S. (2003) Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. *Pharmacol Ther* 100, 257-290
151. Fang, B., Zheng, C., Liao, L., Han, Q., Sun, Z., Jiang, X., and Zhao, R. C. (2005) Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood* 105, 2733-2740
152. Percze-Sas (2006) *Hematológia*, Springer, Budapest
153. Schaefer, A., Magocsi, M., Fandrich, A., and Marquardt, H. (1998) Stimulation of the Ca²⁺-mediated egr-1 and c-fos expression in murine erythroleukaemia cells by cyclosporin A. *Biochem J* 335 (Pt 3), 505-511
154. Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., and Cleveland, J. L. (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922
155. Ujhelly, O., Ozvegy, C., Varady, G., Cervenak, J., Homolya, L., Grez, M., Scheffer, G., Roos, D., Bates, S. E., Varadi, A., Sarkadi, B., and Nemet, K. (2003) Application of a human multidrug transporter (ABCG2) variant as selectable marker in gene transfer to progenitor cells. *Hum Gene Ther* 14, 403-412
156. Apati, A., Janossy, J., Brozik, A., Bauer, P. I., and Magocsi, M. (2003) Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1. *J Biol Chem* 278, 9235-9243
157. Suhasini, M., and Pilz, R. B. (1999) Transcriptional elongation of c-myc is regulated by NF-kappaB (p50/RelB). *Oncogene* 18, 7360-7369
158. Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M. F., and Marshall, C. J. (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science* 280, 109-112
159. Rao, P., and Mufson, R. A. (1994) Human interleukin-3 stimulates a phosphatidylcholine specific phospholipase C and protein kinase C translocation. *Cancer Res* 54, 777-783
160. Bittorf, T., Jaster, R., and Brock, J. (1994) Rapid activation of the MAP kinase pathway in hematopoietic cells by erythropoietin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Cell Signal* 6, 305-311
161. Tilbrook, P. A., Bittorf, T., Busfield, S. J., Chappell, D., and Klinken, S. P. (1996) Disrupted signaling in a mutant J2E cell line that shows enhanced viability, but does not proliferate or differentiate, with erythropoietin. *J Biol Chem* 271, 3453-3459

162. Tang, T., Prasad, K. S., Koury, M. J., and Brandt, S. J. (1999) Mitogen-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced phosphorylation of the TAL1/SCL transcription factor in murine proerythroblasts. *Biochem J* 343 Pt 3, 615-620
163. Okuda, K., Sanghera, J. S., Pelech, S. L., Kanakura, Y., Hallek, M., Griffin, J. D., and Druker, B. J. (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. *Blood* 79, 2880-2887.
164. Bashey, A., Healy, L., and Marshall, C. J. (1994) Proliferative but not nonproliferative responses to granulocyte colony-stimulating factor are associated with rapid activation of the p21ras/MAP kinase signalling pathway. *Blood* 83, 949-957.
165. McCubrey, J. A., May, W. S., Duronio, V., and Mufson, A. (2000) Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 14, 9-21.
166. Sheng, M., Dougan, S. T., McFadden, G., and Greenberg, M. E. (1988) Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 8, 2787-2796.
167. Modiano, J. F., Mayor, J., Ball, C., Chitko-McKown, C. G., Sakata, N., Domenico-Hahn, J., Lucas, J. J., and Gelfand, E. W. (1999) Quantitative and qualitative signals determine T-cell cycle entry and progression. *Cell Immunol* 197, 19-29
168. Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87, 565-576
169. O'Farrell, A. M., Ichihara, M., Mui, A. L., and Miyajima, A. (1996) Signaling pathways activated in a unique mast cell line where interleukin-3 supports survival and stem cell factor is required for a proliferative response. *Blood* 87, 3655-3668
170. Seidler, N. W., Jona, I., Vegh, M., and Martonosi, A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264, 17816-17823
171. Mintz, E., and Guillain, F. (1997) Ca²⁺ transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1318, 52-70
172. Wagner, J. E., Broxmeyer, H. E., Byrd, R. L., Zehnauer, B., Schmeckpeper, B., Shah, N., Griffin, C., Emanuel, P. D., Zuckerman, K. S., Cooper, S., and et al. (1992) Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood* 79, 1874-1881
173. Mui, A. L. (1999) The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55, 1547-1558
174. Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L., and Kitamura, T. (1999) STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *Embo J* 18, 4754-4765
175. Liebermann, D. A., and Hoffman-Liebermann, B. (1989) Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene* 4, 583-592
176. Bamberger, A. M., Milde-Langosch, K., Rossing, E., Goemann, C., and Loning, T. (2001) Expression pattern of the AP-1 family in endometrial cancer: correlations with cell cycle regulators. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 545-550
177. Boren, J., Cascante, M., Marin, S., Comin-Anduix, B., Centelles, J. J., Lim, S., Bassilian, S., Ahmed, S., Lee, W. N., and Boros, L. G. (2001) Gleevec (STI571) influences metabolic enzyme activities and glucose carbon flow toward nucleic acid and fatty acid synthesis in myeloid tumor cells. *J Biol Chem* 276, 37747-37753

178. Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., and Iggo, R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-264
179. Winkelmann, J. C., Ward, J., Mayeux, P., Lacombe, C., Schimmenti, L., and Jenkins, R. B. (1995) A translocated erythropoietin receptor gene in a human erythroleukemia cell line (TF-1) expresses an abnormal transcript and a truncated protein. *Blood* 85, 179-185
180. Klingmuller, U., Bergelson, S., Hsiao, J. G., and Lodish, H. F. (1996) Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8324-8328
181. Goncalves, F., Lacout, C., Feger, F., Cohen-Solal, K., Guichard, J., Cramer, E., Vainchenker, W., and Dumenil, D. (1998) Inhibition of erythroid differentiation and induction of megakaryocytic differentiation by thrombopoietin are regulated by two different mechanisms in TPO-dependent UT-7/c-mpl and TF-1/c-mpl cell lines. *Leukemia* 12, 1355-1366
182. Klampfer, L., Zhang, J., and Nimer, S. D. (1999) GM-CSF rescues TF-1 cells from growth factor withdrawal-induced, but not differentiation-induced apoptosis: the role of BCL-2 and MCL-1. *Cytokine* 11, 849-855
183. Grossi, A., Vannucchi, A. M., Bacci, P., Caporale, R., Cappelli, G., Visconti, G., Pagliai, G., and Ferrini, P. R. (1998) Erythropoietin upregulates the expression of its own receptor in TF-1 cell line. *Leuk Res* 22, 145-151
184. Birkenkamp, K. U., Tuyt, L. M., Lummen, C., Wierenga, A. T., Kruijer, W., and Vellenga, E. (2000) The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway. *Br J Pharmacol* 131, 99-107
185. Pyatt, D. W., Stillman, W. S., Yang, Y., Gross, S., Zheng, J. H., and Irons, R. D. (1999) An essential role for NF-kappaB in human CD34(+) bone marrow cell survival. *Blood* 93, 3302-3308
186. Nagata, Y., Nishida, E., and Todokoro, K. (1997) Activation of JNK signaling pathway by erythropoietin, thrombopoietin, and interleukin-3. *Blood* 89, 2664-2669
187. Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R. J., and Todokoro, K. (1998) Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92, 1859-1869
188. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Hoyle, P. E., Blalock, W. L., Weinstein-Opppenheimer, C., Franklin, R. A., Cherwinski, H., Bosch, E., and McMahon, M. (1998) Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency, prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells. *Leukemia* 12, 1903-1929
189. Jesenberger, V., Procyk, K. J., Ruth, J., Schreiber, M., Theussl, H. C., Wagner, E. F., and Baccarini, M. (2001) Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J Exp Med* 193, 353-364
190. Coulon, V., Veyrune, J. L., Tourkine, N., Vie, A., Hipskind, R. A., and Blanchard, J. M. (1999) A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. *J Biol Chem* 274, 30439-30446
191. Liu, C., Calogero, A., Ragona, G., Adamson, E., and Mercola, D. (1996) EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Crit Rev Oncog* 7, 101-125
192. Alter, B. P. (1994) Biology of erythropoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 731, 36-47

193. Fichelson, S., Freyssinier, J. M., Picard, F., Fontenay-Roupie, M., Guesnu, M., Cherai, M., Gisselbrecht, S., and Porteu, F. (1999) Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. *Blood* 94, 1601-1613
194. Shimizu, R., Komatsu, N., and Miura, Y. (1999) Dominant negative effect of a truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation: possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 27, 229-233
195. Silva, C. M., Lu, H., and Day, R. N. (1996) Characterization and cloning of STAT5 from IM-9 cells and its activation by growth hormone. *Mol Endocrinol* 10, 508-518
196. Bittorf, T., Seiler, J., Ludtke, B., Buchse, T., Jaster, R., and Brock, J. (2000) Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis. *Cell Signal* 12, 23-30
197. Bouscary, D., De Vos, J., Guesnu, M., Jondeau, K., Viguier, F., Melle, J., Picard, F., Dreyfus, F., and Fontenay-Roupie, M. (1997) Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 11, 839-845
198. Fontenay-Roupie, M., Bouscary, D., Guesnu, M., Picard, F., Melle, J., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Dreyfus, F. (1999) Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br J Haematol* 106, 464-473
199. Coffey, P. J., Koenderman, L., and de Groot, R. P. (2000) The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 19, 2511-2522
200. Dai, M. S., Mantel, C. R., Xia, Z. B., Broxmeyer, H. E., and Lu, L. (2000) An expansion phase precedes terminal erythroid differentiation of hematopoietic progenitor cells from cord blood in vitro and is associated with up-regulation of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2. *Blood* 96, 3985-3987
201. Liebermann, D. A., and Hoffman-Liebermann, B. (1994) Genetic programs of myeloid cell differentiation. *Curr Opin Hematol* 1, 24-32
202. Fang, J., Menon, M., Kapelle, W., Bogacheva, O., Bogachev, O., Houde, E., Browne, S., Sathyanarayana, P., and Wojchowski, D. M. (2007) EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood* 110, 2361-2370
203. Pinto, A., Colletta, G., Del Vecchio, L., Rosati, R., Attadia, V., Cimino, R., and Colombatti, A. (1987) c-fos oncogene expression in human hematopoietic malignancies is restricted to acute leukemias with monocytic phenotype and to subsets of B cell leukemias. *Blood* 70, 1450-1457
204. Preisler, H. D., Kinniburgh, A. J., Wei-Dong, G., and Khan, S. (1987) Expression of the protooncogenes c-myc, c-fos, and c-fms in acute myelocytic leukemia at diagnosis and in remission. *Cancer Res* 47, 874-880
205. Ley, T. J., Mardis, E. R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M. D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B. H., McGrath, S., Hickenbotham, M., Cook, L., Abbott, R., Larson, D. E., Koboldt, D. C., Pohl, C., Smith, S., Hawkins, A., Abbott, S., Locke, D., Hillier, L. W., Miner, T., Fulton, L., Magrini, V., Wylie, T., Glasscock, J., Conyers, J., Sander, N., Shi, X., Osborne, J. R., Minx, P., Gordon, D., Chinwalla, A., Zhao, Y., Ries, R. E., Payton, J. E., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Watson, M., Baty, J., Ivanovich, J., Heath, S., Shannon, W. D., Nagarajan, R., Walter, M. J., Link, D. C., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., and Wilson, R. K. (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456, 66-72

206. Witt, O., Sand, K., and Pekrun, A. (2000) Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood* 95, 2391-2396
207. Woessmann, W., and Mivechi, N. F. (2001) Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Cell Res* 264, 193-200
208. Woessmann, W., Zwanzger, D., and Borkhardt, A. (2004) ERK signaling pathway is differentially involved in erythroid differentiation of K562 cells depending on time and the inducing agent. *Cell Biol Int* 28, 403-410
209. Kuzelova, K., Grebenova, D., Marinov, I., and Hrkal, Z. (2005) Fast apoptosis and erythroid differentiation induced by imatinib mesylate in JURL-MK1 cells. *J Cell Biochem* 95, 268-280
210. Fang, G., Kim, C. N., Perkins, C. L., Ramadevi, N., Winton, E., Wittmann, S., and Bhalla, K. N. (2000) CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 96, 2246-2253
211. Chai, S. K., Nichols, G. L., and Rothman, P. (1997) Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 159, 4720-4728
212. Carlesso, N., Frank, D. A., and Griffin, J. D. (1996) Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 183, 811-820
213. Ilaria, R. L., Jr., and Van Etten, R. A. (1996) P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704-31710
214. Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M. P., Bunting, K. D., Rothhammer, K., Roussel, M. F., and Ihle, J. N. (2000) Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood* 96, 2277-2283
215. Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., Tanaka, M., Miyajima, A., Kitamura, T., and Nakauchi, H. (2005) Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med* 202, 169-179
216. Scherr, M., Battmer, K., Winkler, T., Heidenreich, O., Ganser, A., and Eder, M. (2003) Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood* 101, 1566-1569
217. Kang, C. D., Do, I. R., Kim, K. W., Ahn, B. K., Kim, S. H., Chung, B. S., Jhun, B. H., and Yoo, M. A. (1999) Role of Ras/ERK-dependent pathway in the erythroid differentiation of K562 cells. *Exp Mol Med* 31, 76-82
218. Jacquet, A., Colosetti, P., Grosso, S., Belhacene, N., Puissant, A., Marchetti, S., Breitmayer, J. P., and Auberger, P. (2007) Apoptosis and erythroid differentiation triggered by Bcr-Abl inhibitors in CML cell lines are fully distinguishable processes that exhibit different sensitivity to caspase inhibition. *Oncogene* 26, 2445-2458
219. Kolbus, A., Pilat, S., Husak, Z., Deiner, E. M., Stengl, G., Beug, H., and Baccarini, M. (2002) Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med* 196, 1347-1353
220. Waga, K., Nakamura, Y., Maki, K., Arai, H., Yamagata, T., Sasaki, K., Kurokawa, M., Hirai, H., and Mitani, K. (2003) Leukemia-related transcription factor TEL accelerates differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Oncogene* 22, 59-68

221. Faenza, I., Matteucci, A., Bavelloni, A., Marmioli, S., Martelli, A. M., Gilmour, R. S., Suh, P. G., Manzoli, L., and Cocco, L. (2002) Nuclear PLCbeta(1) acts as a negative regulator of p45/NF-E2 expression levels in Friend erythroleukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1589, 305-310
222. Matteucci, A., Faenza, I., Gilmour, R. S., Manzoli, L., Billi, A. M., Peruzzi, D., Bavelloni, A., Rhee, S. G., and Cocco, L. (1998) Nuclear but not cytoplasmic phospholipase C beta 1 inhibits differentiation of erythroleukemia cells. *Cancer Res* 58, 5057-5060
223. Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., and Vogelstein, B. (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297
224. Liu, D., and Xing, M. (2008) Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its potentiation by suppression of the PI3K and NF-kappaB pathways. *Thyroid* 18, 853-864

4.1	Az eritroid differenciációhoz, sejtosztódáshoz és túléléshez kapcsolható jelpályák egymástól való elkülönítése TF-1 sejtekben	43
4.1.1	<i>A GM-CSF növekedési hormon hatása az eritropoetin indukált hemoglobin szintézisre TF-1 sejtekben</i>	43
4.1.2	<i>TF-1 sejtek proliferációja és életképessége az eritropoetin indukált eritroid differenciáció során</i>	44
4.1.3	<i>GM-CSF illetve eritropoetin kezelés hatása a c-Myb transzkripciós faktor funkcionális aktivitására TF-1 sejtekben</i>	47
4.1.4	<i>Mitogén Aktivált Protein Kináz Kaszkádok (MAPK) aktivitásának vizsgálata TF-1 sejtekben GM-CSF illetve Epo citokin stimulusok hatására</i>	48
4.1.5	<i>Az Epo és a GM-CSF hatása a c-Fos és az Egr-1 az azonnali korai válaszadó gének expressziójára, valamint az AP-1 és az Egr-1 transzkripciós faktorok DNS-kötő képességére</i>	50
4.1.6.	<i>Az Epo és a GM-CSF hatása az NF-κB és a STAT-5 transzkripciós faktorok funkcionális aktivitására</i>	52
4.2	Az intracelluláris szabad [Ca ²⁺] megemelkedése által aktivált jelpályák hatása TF-1 sejtek differenciációjára, túlélésére illetve proliferációjára	53
4.2.1	<i>A citoplazmatikus szabad kalcium koncentráció megemelésének hatása TF-1 sejtek eritroid irányú differenciációjára, azaz hemogloblin tartalmára</i>	54
4.2.2	<i>Az ERK1/2 MAP kinázok kalcium-függő aktivációjának vizsgálata TF-1 sejtekben</i>	55
4.2.3	<i>A [Ca²⁺]-i emelkedés által kiváltott sejtválaszok vizsgálata TF-1 sejtekben: a sejtszám és az életképesség változásai, valamint a MEK kináz szerepe az említett folyamatokban</i>	56
4.2.4	<i>Az [Ca²⁺]-i emelkedés hatása a c-Fos és az Egr-1 fehérjék expressziójára, valamint az AP-1 transzkripciós faktor aktivitására: az ERK1/2 kinázok szerepe</i>	58
4.3.	Citokin-receptor közvetített jelpályák normálistól eltérő aktivitásának vizsgálata mielodiszplázia esetén és az MDS akut limfoid leukémiává történő blasztos transzformációját követően	61
4.3.1	<i>Az ERK 1/2, STAT-5, c-Fos, Egr-1 és AP-1 mitogén szignálok Epo- illetve GM-CSF stimulusra adott válasza egészséges (normál) minták esetén</i>	62
4.3.2.	<i>Az ERK 1/2, STAT-5, c-Fos, Egr-1 és AP-1 mitogén szignálok Epo- illetve GM-CSF stimulusra adott válasza MDS refrakter anémia (RA) esetén</i>	63
4.3.3.	<i>A STAT5 és AP-1 transzkripciós faktorok DNS-kötő képességének, valamint a c-Fos és Egr-1 fehérjék expressziós szintjeinek változásai MDS/AML blasztos transzformációt követően illetve de novo AML esetében</i>	64
4.4	A Bcr-Abl fúziós fehérje által közvetített -proliferációhoz és túléléshez kapcsolható-jelpályák aktivitásában bekövetkező változások vizsgálata K562 sejtek eritroid differenciációja során	66
4.4.1	<i>A Bcr-Abl fehérje, valamint az ERK1/2 aktivitás farmakológiai gátlásának hatása K562 sejtek hemoglobin tartalmára, túlélésére és növekedésére</i>	66
4.4.2	<i>A stabilan beépülő Bcr-Abl ellen termeltetett shRNS-ek hatása K562 sejtek ERK aktivitására, differenciációjára és túlélésére</i>	72